



ANGIOGENESIS Y CÁNCER COLORRECTAL

DOCTORANDO Teofilo Cubo Cintas

DIRECTOR DE LA TESIS Prof. Dr. D. E. Arévalo Jiménez
Catedrático de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de
Córdoba.

Jefe de Servicio de Cirugía del Aparato Digestivo del hospital Regional
Reina Sofía. Córdoba.

Dr. D. J. Hernández Calvo
Jefe de Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Complejo
Hospitalario de Ciudad Real.

Centro Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Complejo
Hospitalario de Ciudad Real

CIUDAD REAL 2001

INDICE

Introducción	3
Hipótesis	23
Objetivos	25
Material y Métodos	26
Resultados	33
Discusión	54
Conclusiones	64
Bibliografía	66

ANGIOGENESIS Y CÁNCER COLORRECTAL

INTRODUCCIÓN

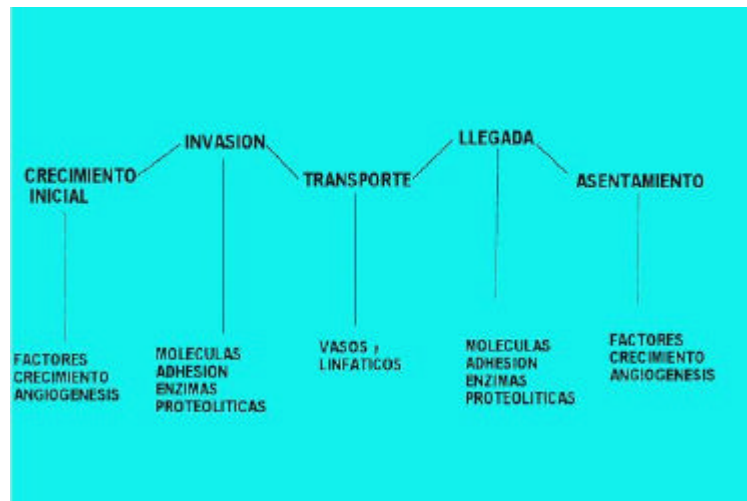
El cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar en frecuencia de aparición en todo el mundo. En España, aunque la incidencia es mas baja que en otros países desarrollados, es el segundo más frecuente en varones después del cáncer de pulmón, con una incidencia del 11.8%. En la mujer la incidencia es del 14.3%, ocupando el segundo lugar después del cáncer de mama. En 1994, 7266 personas murieron de cáncer colorrectal en nuestro país (1).

A pesar de la aparición de nuevos métodos diagnósticos, técnicas quirúrgicas más agresivas (2), y mejor terapia coadyuvante, al menos un tercio de los pacientes intervenidos quirúrgicamente debido a cáncer colorrectal con intención curativa, mueren a consecuencia de recidiva neoplásica local o a distancia.

La supervivencia global a los cinco años se cifra en un 60%. Sin embargo hasta el 15-20% de enfermos con cáncer colorrectal en estadios precoces sucumbirá a su enfermedad y este porcentaje aumentará hasta el 40-80% en estadios avanzados(3). Se estima que entre un 10-25% de los enfermos presentan metástasis en el momento del diagnostico y que entre un 60-70% de los enfermos que mueren por cáncer colorrectal desarrollan metástasis hepáticas(4). La aparición de metástasis representa por lo tanto un serio obstáculo en el tratamiento de estos enfermos.

PROCESO METASTASICO

El proceso metastático es secuencial y conlleva una serie de etapas que deberán completarse.(Fig. 1).



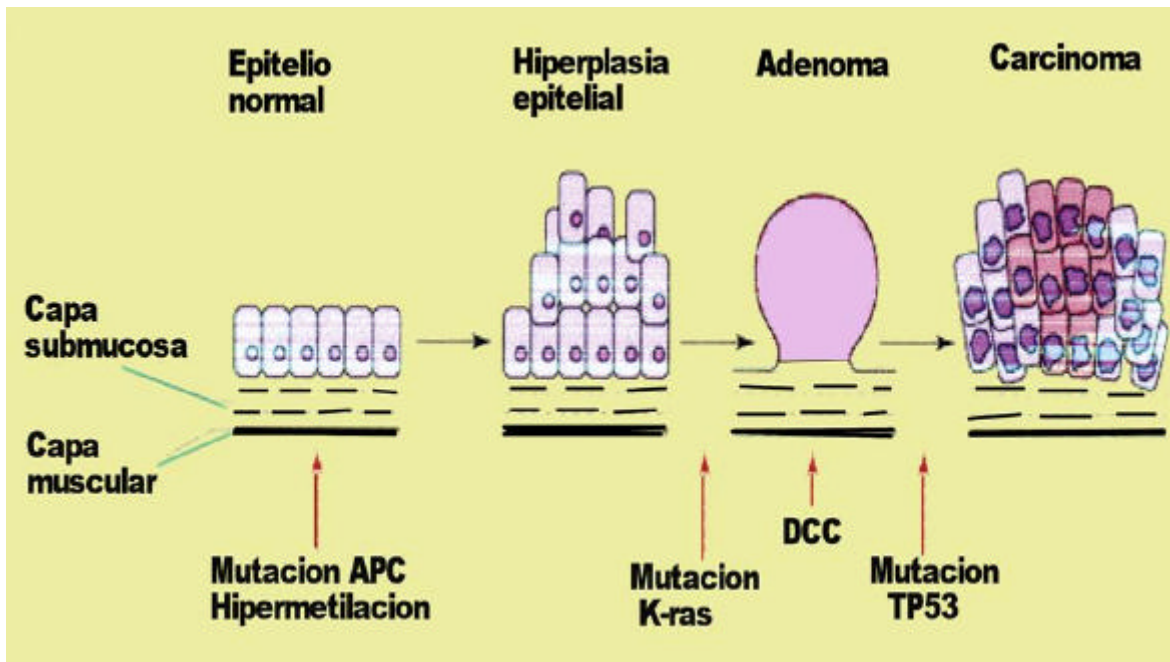
- 1) Crecimiento tumoral inicial.
- 2) Invasión local.
- 3) Diseminación sanguínea.
- 4) Invasión del órgano diana.
- 5) Establecimiento y crecimiento progresivo en el órgano diana.

Sin embargo y a pesar de los efectos devastadores sobre el huésped, el proceso metastático encuentra muchas dificultades para su conclusión. Fidler, en 1970, observa que menos del 1% de las células tumorales radiomarcadas sobreviven en el torrente circulatorio a las 24 horas y de estas, menos del 0.1%, son capaces de metastatizar(5).

El desarrollo secuencial por etapas del proceso metastático puede ser considerado ventajoso desde el punto de vista clínico, ya que el conocimiento de las diferentes moléculas , que intervienen en cada etapa, posibilita la aparición de nuevos métodos terapéuticos.

1) CRECIMIENTO TUMORAL INICIAL

Factores de crecimiento.- Según el modelo propuesto por Fearon y Vogelstein(1990), el cáncer colorrectal se desarrollaría de una forma ordenada, a través de una serie de cambios genéticos(6). (Fig.2). Existe la hipótesis que considera la aparición de células tumorales con un fenotipo bioquímico diferente, alta malignidad y poder metastático dentro del tumor primitivo y en su progresión a fases avanzadas (7).



Entre las alteraciones genéticas específicas cuya expresión molecular se relaciona con el proceso metastático se encuentra el *k-ras* (12p), presente en el 40-50% de los cánceres colorrectales esporádicos y relacionado con la formación de adenomas(8). La aparición de mutaciones del *k-ras* disminuyen la supervivencia y el periodo libre de enfermedad en el cáncer colorrectal(9-11).

Entre los genes supresores destaca el *p53* (17p), cuya mutación aparece en el 70-80% de los cánceres colorrectales(12), e interviene en la transformación de adenoma a carcinoma(6), siendo su papel en la angiogenesis fundamental. La sobre expresión de la proteína *p53*, se utiliza como marcador de las mutaciones del *p53*, y se relaciona con un

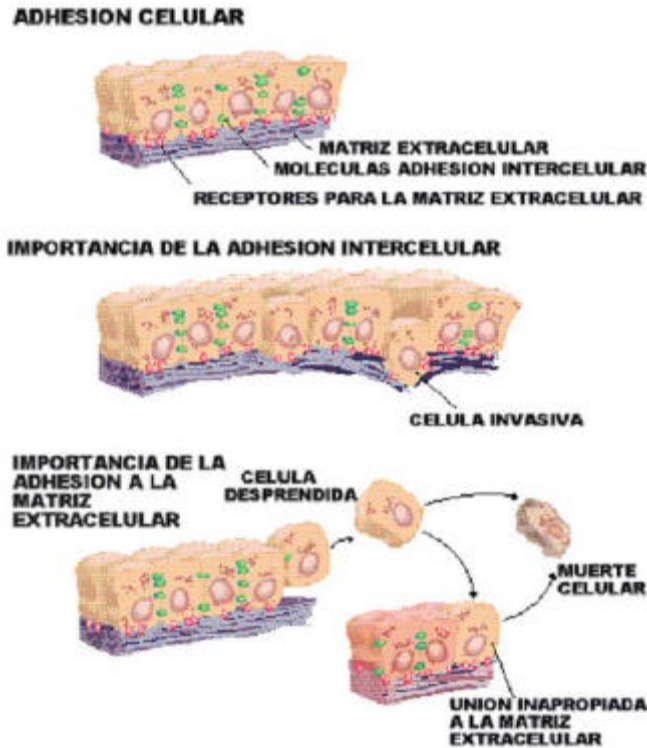
peor pronóstico.(13-17). La presencia de mutaciones del p53 se puede realizar mediante estudio secuencial del DNA complementario, encontrando también valor pronóstico(11-18).

La mutación o pérdida del *gen deletado del cáncer colorrectal, (DCC)*, relacionado con las moléculas de adhesión , también intervendrá en la progresión de adenoma a carcinoma(19), y se relaciona con tumores en estadios más avanzados(20,21) y con peor pronóstico(22).

Por último hablaremos del *nm23* considerado como gen supresor del proceso metastático. La expresión de dos proteínas: nm23-H1 y nm23-H2 en el cáncer colorrectal y su significación son controvertidas. Mientras unos autores encuentran que una expresión reducida del nm23 se asocia con estadios avanzados de la enfermedad y metástasis(23,24), otros encuentran que la sobreexpresión del nm23 se relaciona con recurrencia, metástasis hepáticas y supervivencia disminuida(25-27).Esta aparente contradicción es explicada por Berney(27), que cree que la sobreexpresión del nm23 sería debida a una proteína nm23 de tipo mutante como consecuencia de la delección del nm23. No obstante otros trabajos recientes no han podido relacionar la expresión del nm23 con el estadiaje y/o pronóstico (28-30).

2) INVASIÓN LOCAL

2.1 Moléculas de adhesión.- Para que las células tumorales, puedan invadir tejidos adyacentes, deban ser capaces de desprenderse del tumor primario, venciendo unas fuerzas de adhesión que tienden a mantenerlas unidas, gracias a unas moléculas de adhesión: cateninas y E-caderina. Enfermos por cáncer colorrectal en estadios avanzados muestran niveles bajos de alfa catenina y E-caderina(31,32). Por lo tanto algunos autores asocian esta reducción con tumores más indiferenciados y peor pronóstico(33,34).Fig(3)



2.2 Enzimas proteolíticas.- A continuación las células deben abrirse paso a través de la membrana basal, compuesta por glicoproteínas y proteoglicanos, y que descansa sobre la matriz extracelular, un enrejado de fibras de colágeno y elastina embebidas también en proteoglicanos y glicoproteínas. La degradación tanto de la membrana basal como de la matriz extracelular, es posible gracias a una serie de enzimas proteolíticas que son secretadas al medio extracelular en forma de proenzimas tanto por células tumorales como por las células del tejido conectivo normal. Hasta el momento se conocen cuatro familias distintas de proteasas: serín proteasas, cisteinil proteasas, aspartil proteasas y metaloproteasas.

El primer componente de la familia de las metaloproteasas fue descrito por Liotta a finales de los años setenta. Se trataba de una proteasa producida por tumores murinos, capaz de degradar el colágeno tipo IV a pH neutro (35). Desde entonces, numerosos estudios experimentales han permitido caracterizar otros componentes de esta extensa familia, así

como el papel que juegan en el desarrollo de tumores malignos. (36-39). En la actualidad se sabe que se trata de endopeptidasas zinc dependientes, que globalmente se caracterizan porque son secretadas al medio extracelular en forma de proenzimas solubles, activadas por acción de otras proteasas de la misma familia o del sistema de activación del plasminógeno. Son susceptibles a la acción de inhibidores endógenos y en condiciones fisiológicas, participan en los procesos de remodelación tisular, cicatrización y angiogénesis.

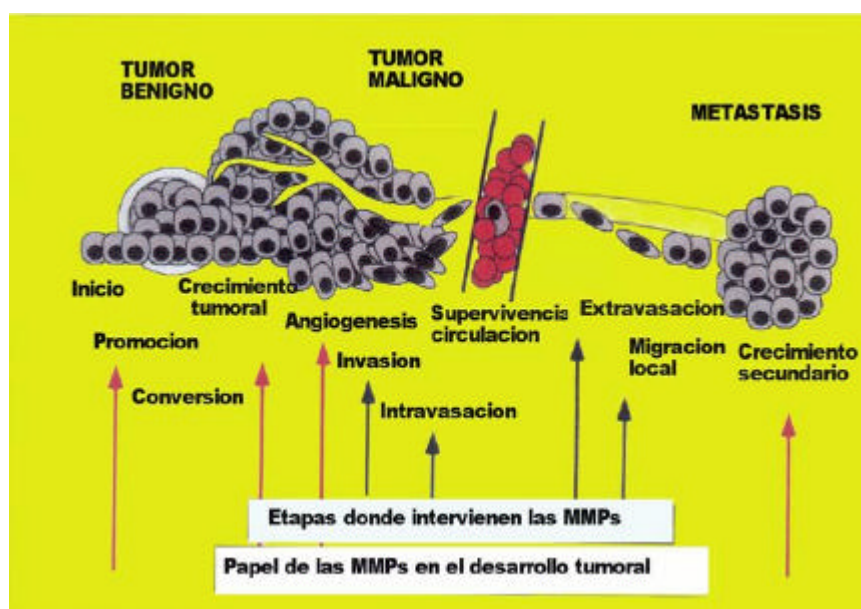
Los componentes de la familia se pueden subdividir en cuatro grupos basándose en la especificidad de su substrato y en sus características estructurales (Tabla 1) (36). Dentro de este extenso grupo, las metaloproteasas que más se han relacionado con los procesos de invasión tumoral y metástasis son aquellas que degradan específicamente el colágeno tipo IV: gelatinasa A (MMP-2), gelatinasa B (MMP-9), estromelisin-1 (MMP-3) y estromelisin-2 (MMP-10). (K. Porter-Jordan y M.E. Lippman, 1994).

En condiciones fisiológicas, la producción y activación de las metaloproteasas está sujeta a un estricto control tanto a nivel genético como estructural. Existe además un tercer mecanismo regulador que viene a reforzar los anteriores, y es la presencia en el organismo de inhibidores específicos. Se conocen al menos cuatro de estos inhibidores, que en conjunto se denominan inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMP). Todos ellos inhiben a la mayoría de las metaloproteasas en su forma activa, y algunos además son secretados formando complejos y bloqueando la proenzima (36, 40).

Numerosos estudios han demostrado la localización predominante de MMP-9 y MMP-2 en la interfase tumor-estroma tanto en los tumores colorrectales primarios como en las metástasis hepáticas (40-43). Mediante técnicas de hibridación in situ e inmunohistoquímica, se ha demostrado la producción mayoritaria de MMP-9 por las células estromales peritumorales (fibroblastos y macrófagos) in vivo. Las células tumorales actuarían induciendo la producción de MMP-9, probablemente por la acción de factores paracrinós, aunque estos mecanismos

están aún bajo investigación. (41, 44,45). Estos datos sugieren que MMP-9 juega un papel importante en la capacidad metastásica del carcinoma colorrectal. Dependiendo de la técnica de identificación empleada, la mayoría de los autores coinciden en que existe correlación entre la presencia de niveles elevados de MMP-9 y el grado de diferenciación tumoral (46-47). Zeng y cols. demostraron por primera vez además el valor pronóstico de MMP-9 RNA: niveles elevados se relacionaban con menor supervivencia y mayor riesgo de recidiva tras cirugía. (48).

Kim y cols. (49) encuentran una correlación positiva entre MMP-9 y MMP-2 y angiogénesis en el cáncer colorrectal, siendo las metaloproteasas marcadores de agresividad local frente a la angiogénesis, predictora de enfermedad metastásica Fig(4)



Niveles elevados de estromelisina 3, MMP-1 y matrilisina (MMP-7) también se han detectado en carcinoma colorrectal, frente a niveles escasos o ausentes en adenomas y mucosa normal. (50-52).

Además de las metaloproteinasas, otras enzimas proteolíticas como la catepsinas, sobre todo la catepsina B, también se encuentran implicadas en este proceso. Las catepsinas son enzimas proteolíticas lisosómicas implicadas en una gran variedad de procesos fisiológicos, ampliamente distribuidas en tejidos sanos, con una concentración mayor en células esplénicas, renales, hepáticas y en macrófagos. Las catepsinas tienen un peso molecular que varía entre 14 y 650 Kda. Son sintetizadas en los ribosomas celulares desde donde son transferidos al retículo endoplásmico, al aparato de Golgi, y finalmente a los lisosomas mediante el reconocimiento por un receptor de la manosa 6-fosfato presente en la molécula enzimática. Sintetizadas como pre-proenzimas, posteriormente tras un proceso de glicosilación y fosforilación alcanzarán su forma enzimática activa(53).

Procesos oncogénicos e inflamatorios, hacen posible que se produzca una alteración en el transporte de las catepsinas hasta los lisosomas, lo que provoca su secreción a la matriz extracelular.

Las catepsinas se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas, con subdivisión de acuerdo a la actividad lítica y estructura aminoácida en sus centros activos. Las catepsinas B,H,K,L,S y T, son endopeptidasas que pertenecen a la familia de las cisteina-proteinasas. La catepsina G, también se define como endopeptidasa, aunque dentro de las serina-proteinasas. Las catepsinas D y E, son endopeptidasas con aspartato como parte de su centro activo. Por su parte las catepsinas A y C, son clasificadas como serina y dipeptidil respectivamente exopeptidasas (53).

Niveles elevados de algunas catepsinas se han asociado con la destrucción patológica de la matriz extracelular, permitiendo el desarrollo de metástasis, e interviniendo en la aparición y mantenimiento de múltiples enfermedades: arteriosclerosis, enfisema pulmonar, osteoporosis y artritis reumatoide. Keyszer(54), cuantificó los niveles séricos de las catepsinas B,H y L

en la artritis reumatoide, sin encontrar elevación de las mismas, que pudiera justificar el uso de estos valores como marcadores de la actividad de la enfermedad inflamatoria.

Las catepsinas B, L y D intervienen en el proceso degenerativo del tejido extracelular y en la regulación de determinados factores de crecimiento en procesos neoplásicos como son el cáncer de mama, colorrectal y gástrico(55-58).

Maciewicz et al(59) , describen una actividad similar de las catepsinas B y L en la lisis de la matriz extracelular tras cuantificar su actividad en la progresión neoplásica del cáncer colorrectal mediante un estudio in vitro, de células premalignas y malignas. Por su parte, Schwartz(53), y Mayer(61) , también confirmaron la elevación de la catepsina D en tejido neoplásico colorrectal respecto a determinaciones inmunohistoquímicas en tejido sano. Sin embargo sería Adenis et al(56) , quienes al comparar la actividad tras estudio histológico de las catepsinas B, L y D en tejido neoplásico colorrectal y tejido sano adyacente, demostraron una elevación de todas las catepsinas en el tejido tumoral aunque consideraron a la catepsina B como la enzima de mayor sensibilidad y por lo tanto de gran valor en la progresión del cáncer colorrectal.

La catepsina B actúa directamente degradando los componentes de la matriz extracelular mediante una actividad dipeptidilcarboxipeptidasa o indirectamente estimulando otras proteasas de la matriz extracelular y degradando sus inhibidores proteicos(53). Su actividad se realiza en un pH tanto ácido como neutro, lo que facilita la progresión neoplásica y el grado extensión(61,62) . La catepsina es una endopeptidasa con cisteína como parte de su centro activo. Se encuentra formada por una cadena ligera cuyo peso molecular es de 5 Kda y que contiene el centro activo, y una cadena pesada de 24 Kda. Es inhibida mediante iodoacetato o 4-cloromercuribenzoato

La presencia de niveles elevados de catepsina B en diferentes procesos neoplásicos, fue demostrada por Hirano et al(61), mediante el estudio de determinaciones plasmáticas y en

orina de enfermos con cáncer colorrectal, gástrico, mamario y de vesícula. Encontraron que las determinaciones en enfermos neoplásicos eran muy superiores respecto los enfermos con patología benigna, y que incluso en aquellos pacientes con metástasis los niveles séricos y urinarios eran más elevados respecto a enfermos sin afectación metastásica. Llegaron a la conclusión de que la catepsina B podría ser un aceptable marcador tumoral sobre todo a la hora de detectar metástasis remotas. En el cáncer colorrectal, la catepsina B, parece ser el parámetro más discriminante y de mayor valor pronóstico respecto al resto de las familias de las catepsinas. Khan et al (63), estudiaron el papel de la catepsina B en estadios precoces del cáncer colorrectal, y establecieron la relación entre la elevación de la expresión de la catepsina B, y la disminución de la laminina en la membrana basal en el cáncer colorrectal, para concluir que niveles elevados de la catepsina B podrían relacionarse con la secuencia de transformación adenoma-carcinoma colorrectal. En estudios recientes, Hirai (64), confirma la elevación de la catepsina B en estadios precoces y como Hirano et al(61), destaca su papel a la hora de detectar metástasis remotas. La importancia de la catepsina B en el proceso metastático del cáncer colorrectal, es reafirmada por Van Noorden et al(65), en animales de experimentación. Estos autores incluso nos abren nuevos horizontes hacia la utilización de agentes terapéuticos futuros que inhibiendo la actividad de la catepsina B permiten el control de la extensión de la enfermedad neoplásica colorrectal. Para ello introducen el uso vía oral de un inhibidor selectivo de la catepsina B, Mu-Phe-homoPhe-fluoromethylketone, el cual permitió la reducción a un 60% de la aparición de metástasis hepáticas, así como la disminución en un 80% del volumen de las metástasis hepáticas existentes.

Murnane(1997), analizando las catepsinas B, L y las metaloproteinas 9, ha definido un perfil proteolítico de carcinoma colorrectal: precoz, medio, tardío y alto, relacionándolo con el estadio clínico(66).

Todas las células, incluidas las tumorales, cuando pierden contacto entre sí o penetran en la matriz extracelular, sufren un tipo de apoptosis (muerte celular programada) denominada *anoikis*. Las células tumorales son capaces de desarrollar resistencia frente a esta muerte celular, elaborando un tipo de moléculas de adhesión como son las integrinas (67). Estudios experimentales de cáncer colorrectal, tanto *in vitro* como *in vivo*, muestran un aumento de las subunidades $\alpha 6 \beta 4$ y $\alpha 5 \beta 3$ de las integrinas y la relacionan con mayor agresividad del cáncer colorrectal (68,69).

La migración de las células tumorales a través de la matriz extracelular, les permitirá alcanzar los vasos tumorales neoformados o los del huésped. En esta etapa una citoquina, *factor de movilidad autocrina (AMF)* facilita una mayor movilidad de las células tumorales. Algunos autores relacionaron una sobreexpresión de los receptores gp78 para el AMF en tumores colorrectales, con un alto índice de recurrencia y menor supervivencia (70,71).

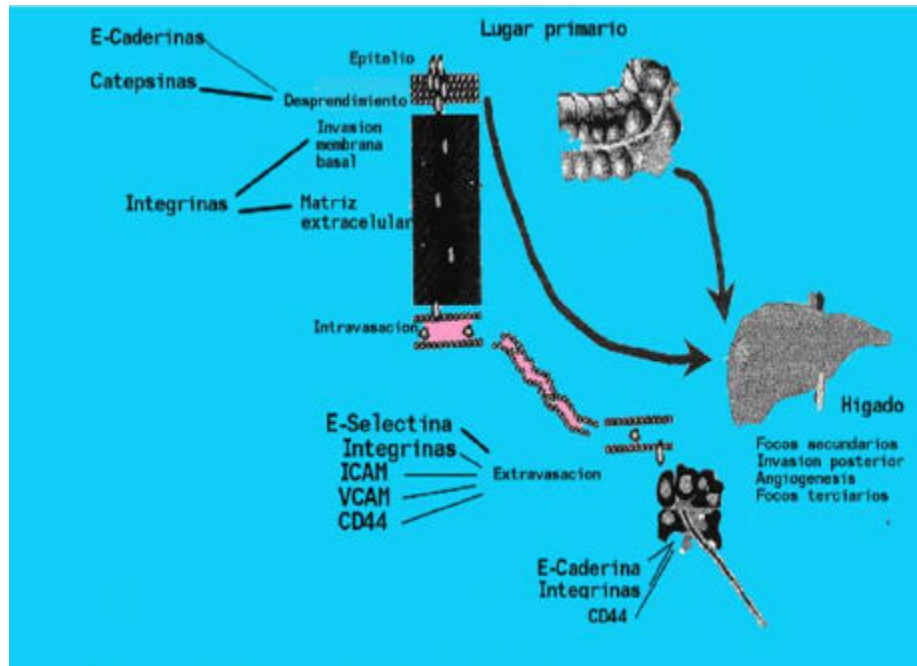
3) DISEMINACION SANGUINEA

Una vez en el torrente circulatorio, las células tumorales deben hacer frente al sistema inmunitario para poder acceder al órgano diana. Posiblemente uno de los medios empleados sería la unión a los linfocitos T, la cual se realizaría gracias a una serie de glicoproteínas como la ICAM-1. Se han encontrado niveles elevados de ICAM-1, en pacientes con cáncer colorrectal, respecto a individuos sanos. El suero de estos enfermos es capaz de inhibir la agregación celular, disminuyendo el porcentaje de lisis específica. Este efecto desaparece, cuando se depleciona el suero de ICAM-1 (72,73). Por su parte, el antígeno carcinoembrionario (CEA), actuaría como una molécula de adhesión, facilitando la unión de las células tumorales entre sí y entre las células del huésped.

4) INVASION DEL ORGANO DIANA

4.1 Moléculas de adhesión.-En los capilares del órgano a metastatizar, las células tumorales, contactan y crean una unión con las células endoteliales, gracias a las moléculas de adhesión. Entre ellas destaca la E-selectina, encontrándose más elevada en pacientes con cáncer colorrectal con metástasis hepáticas, que en pacientes sin metástasis(74,75). Unos oligosacaridos de cadena larga, las sialyl-LewisX, presentes en los leucocitos pero también en células de cáncer colorrectal, se encuentran elevados en pacientes de cáncer colorrectal con metástasis hepáticas(76-79). Otra glicoproteína, la CD44, presente en linfocitos y algunos tejidos, media en la unión intercelular y de las células con la matriz extracelular. Las variantes CD44 v6,v8-10, han sido relacionadas con metástasis y recurrencia(80,81). En cambio los niveles plasmáticos de CD44, no se han podido relacionar con el estadio de la enfermedad(82).

4.2) Moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas.-Las células tumorales después de completada esta unión a las células endoteliales, deben extravasarse y atravesar la matriz extracelular, en un proceso inverso al de la invasión , pero en el que participan los mismos tipos de moléculas: moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas.(Fig. 5)



ANGIOGENESIS

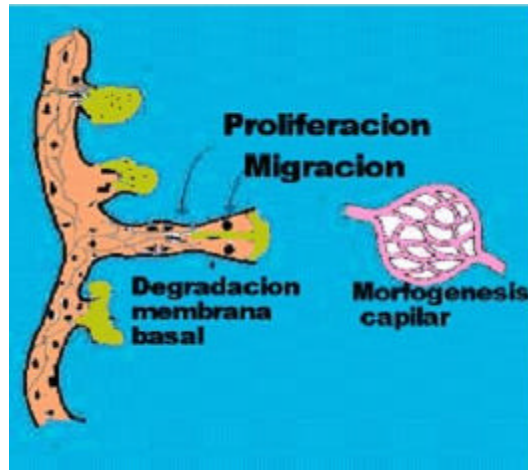
Definición.- Por angiogenesis entendemos la formación de vasos nuevos, a partir de los ya existentes.

La angiogenesis está sometida a homeostasis y en comparación con otros tejidos, el recambio celular es muy lento; de forma que en un momento determinado, solo el 0.01% de las células endoteliales, se encuentran en fase de división, comparado con el 14%, por ejemplo, de las células epiteliales intestinales.

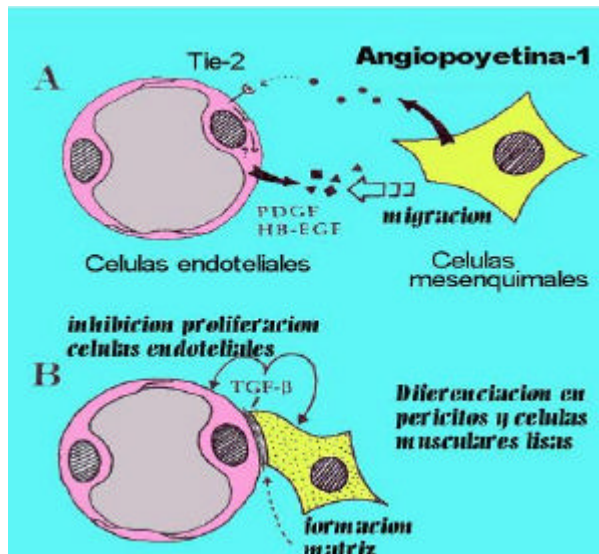
La angiogenesis es un proceso secuencial, en el que una vez que las células endoteliales han sido activadas, se producen cuatro etapas diferenciadas:

- Degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular, gracias a enzimas proteolíticas.
- Proliferación y diferenciación de células endoteliales.
- Retracción de los pericitos, que permiten la salida y migración de las células endoteliales, que comienzan a formar cordones sólidos.

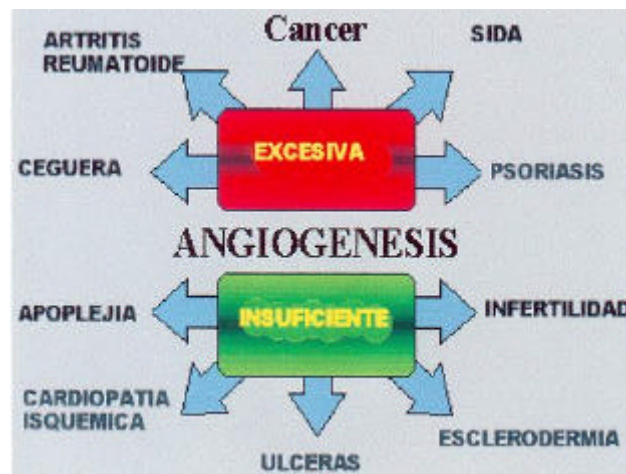
- d) Recanalización de estos cordones, con la formación de nuevos vasos, que se anastomosan con los ya existentes, iniciándose el flujo sanguíneo. Fig(6)



Estos vasos recién formados son inmaduros, careciendo de pericitos y células musculares, es necesaria una fase de maduración, para considerar normales estos vasos neoformados(34). Fig(7)



El proceso angiogenico, tiene lugar en condiciones fisiológicas como el ciclo menstrual y cicatrización; pero desviaciones por exceso o por defecto, pueden dar lugar a diversos procesos patológicos. Fig(8)



Con respecto al cáncer, la angiogenesis, desde hace 50 años ha sido objeto de atención y estudio. Es en 1945 cuando Algire y Clarkey, publican sus observaciones, sobre la vascularización de tejidos tumorales en animales.(83). Un año después, Coman y Sheldon, observan una intensa hiperemia en la piel próxima a tumores implantados en ratones y que atribuyan, a la aparición de una red capilar, que conectaba con los vasos del huésped. (84).

Shubi en 1968, es el primero en acuñar el termino de angiogenesis tumoral(85); pero es a partir de los 70 cuando el estudio y conocimiento de la angiogenesis, toma impulso, gracias a los trabajos de Folkman, que hipotetiza que el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis, dependen de la angiogenesis(86) y que serían las propias células tumorales, las que elaborarían factores de crecimiento favorecedores de la angiogenesis.(87,88).

Debe transcurrir una década para que estas hipótesis, obtengan confirmación, con el descubrimiento en 1984, del factor de crecimiento básico de los fibroblastos, aislado en un

condrosarcoma (89) y reconocido como un potente inductor de la angiogenesis(90). Posteriormente se descubre el factor de crecimiento del endotelio vascular(VEGF) (91,92), su estructura molecular(93) y su potente acción sobre la permeabilidad vascular(94). En 1990 Folkman recoge una serie de conocimientos sobre la angiogenesis(95), entre ellos destaca: que tumores implantados en el liquido acuoso, de la cámara anterior del ojo, que es avascular, estos tumores se mantienen viables, avasculares y limitados en su crecimiento (menores de 1 mm^3). Cuando estos tumores se trasladan al iris, muy vascularizado, se produce neovascularización y crecen con rapidez, alcanzando en dos semanas un tamaño 16000 veces mayor al original. Se comienza a hablar de dos fases, en el desarrollo tumoral: una avascular, con crecimiento limitado y nula capacidad de crecimiento a distancia y otra vascular con crecimiento exponencial y posibilidad de metastatizar, toda vez que las células tumorales pueden alcanzar los vasos sanguíneos y linfáticos. Dos teorías tratan de explicar el paso entre una y otra fase. La primera, mantiene que las células responderían a la hipoxia, falta de nutrientes y acumulación de metabolitos, con la sobreproducción de factores angiogenicos(96-98). La segunda, se basa en el concepto del interruptor angiogenico, según el cual, la angiogenesis estaría regulada por activadores e inhibidores. El encendido del interruptor angiogenico o adquisición del fenotipo angiogenico, vendría determinado genéticamente, mediante la aparición de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores; estos cambios genéticos tendrían lugar precozmente, aun en estados preneoplasicos(99). Algunos modelos experimentales, han demostrado, como ciertos oncogenes: v-ras, v-raf, K-ras, son capaces de inducir la angiogenesis por sobreproducción de VEGF(100,101), al mismo tiempo que disminuyen la producción de trombospondina-1, que es un potente inhibidor de la angiogenesis(102). Por su parte la perdida o mutación del p53, tiene una acción similar con disminución de la trombospondina-1 y aumento del VEGF, aunque el efecto predominante es la disminución de la trombospondina(103,104). Durante la última

década, la angiogenesis, se perfila como un mecanismo complejo, pero perfectamente regulado, en el que intervienen:

- i) Activadores
- ii) Inhibidores
- iii) Receptores específicos de las células endoteliales .

1) ACTIVADORES.- i) *VEGF*. El factor de crecimiento del endotelio vascular, es una glicoproteína de 45000 daltons, con cuatro isoformas: $VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$ y $VEGF_{206}$. El $VEGF_{121}$ y una pequeña parte del $VEGF_{165}$, se encuentran en forma libre, en tanto que la mayoría del $VEGF_{165}$ y la totalidad del $VEGF_{189}$ y $VEGF_{206}$, se encuentran secuestrados en la matriz extracelular(106). El VEGF es producido y secretado, por una amplia variedad de tejidos normales, incluidos macrófagos, pero también lo es por ciertos tumores, entre ellos los colorrectales(107,108). El VEGF es un potente mitogeno, casi exclusivo, de las células endoteliales y esta actividad es sinérgica, con la de otro factor angiogenico: el factor básico de crecimiento de los fibroblastos (bFGF). (109). El VEGF, induce la formación de activadores del plasminogeno y metaloproteinasas, las cuales degradarían la matriz extracelular, lo que permitiría la migración de las células endoteliales, que es el primer paso de la angiogenesis(110). Así mismo incrementa notablemente la permeabilidad vascular, permitiendo la fuga de proteínas plasmáticas al intersticio, constituyendo un gel, que serviría de sustrato para la proliferación y migración de las células endoteliales(111). Por último el VEGF tiene una importante acción quimiotaxica para los macrófagos, los cuales a su vez son capaces de inducir la formación de VEGF, ya sea directamente o liberando el VEGF secuestrado en la matriz extracelular(112,113).

ii) *Factores ácido y básico de crecimiento de los fibroblastos(FGF-1 Y FGF-2)*. Los FGF-1 y FGF-2 pertenecen a una familia de 13 proteínas con alta afinidad por la heparina, por lo que inicialmente se les denominó: factores de crecimiento unidos a la

heparina(HBGF) (114,115). Son producidos por tejidos normales y también por algunos tumores. Tienen una acción mitogena y migratoria sobre las células endoteliales, potenciado la acción del VEGF(109). Son capaces de inducir a las células endoteliales para que elaboren activador del plasminogeno y colagenasas, que degradaran la membrana basal vascular, permitiendo la migración de las células endoteliales(116).

iii) Factor de crecimiento de las células endoteliales derivado de las plaquetas(PD-ECGF). Aunque inicialmente descubierta en las plaquetas, esta proteína se encuentra en tejidos normales y predominantemente en los macrófagos(117,118). Su estructura es idéntica a una enzima: la timidin fosforilasa, la cual se encuentra en una amplia variedad de tumores, entre ellos el colorrectal(119,120). La acción angiogenica de la timidin fosforilasa, se debe a la quimiotaxis que ejerce sobre las células endoteliales, favoreciendo su migración, pero a diferencia del VEGF y los FGF, no tiene acción mitogena(121).

iii) Angiogenina(ANG). Es un polipéptido de 14 k-Da, aislado originalmente en una línea celular de adenocarcinoma de colon humano, la H-29 y producido por numerosos tipos celulares(122). La función que desempeña en la angiogenesis es doble, por una parte contribuye a la lisis de la membrana basal y por otra facilita la migración y adhesión de las células endoteliales a la matriz extracelular.

iiii) Angiopoyetinas. La angiopoyetina –1 es una glicoproteína de 70 kDa, descubierta por Davis y colaboradores en 1996(123). actúa sobre los receptores Tie-2 de las células endoteliales, que a su vez y mediante el factor de crecimiento derivado de las plaquetas(PDGF), induciría a las células mesenquimales circundantes su diferenciación en pericitos y células musculares lisas, es decir participaría en la remodelación y estabilización de los vasos neoformados. La angiopoyetina-2 también actúa sobre los receptores Tie-2 de las células endoteliales y en presencia de VEGF,

contribuyen a la remodelación y maduración de los vasos neoformados, pero en ausencia de VEGF, se produce regresión y apoptosis de los mismos(124,125).

2) INHIBIDORES.-i) *Angiostatina*. Es una proteína de 38kDa, fracción del plaminogeno. Su acción antiangiogenica la ejerce fundamentalmente inhibiendo la proliferación de las células endoteliales e induciendo su apoptosis(126).

ii) *Endostatina*. Es un fragmento del colágeno XVIII de 20kDa. Su acción antiangiogenica es idéntica a la de la angiostatina pero 30 veces más potente(127).

iii) *Trombospondinas 1y2*. Se trata de glicoproteinas elaboradas por plaquetas y fibroblastos, que disminuyen la angiogenesis, inhibiendo la proliferación y migración de las células endoteliales(128,129).

iiii) *Interferón a , b*. La familia del interferón(IFN), la constituyen tres glicoproteinas: IFN- α producida por linfocitos y macrófagos; IFN- β producida por fibroblastos y algunas células epiteliales y el IFN- γ producida por las células T. La acción antiangiogenica del IFN- α y del IFN- β , es debida a la potente inhibición en la producción de VEGF y FGF-2(130).

3) RECEPTORES DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES. Las células endoteliales poseen receptores especificos para el VEGF y las angiopoyetinas, ambos pertenecen a la familia de las tirosinoquinasas. Los receptores del VEGFson:

Flt-1 o VEGF-R1

Flk-1/KDR o VEGF-R2

Ambos tienen una gran afinidad por el VEGF, pero con distinta traducción. Mientras que el VEGF al unirse a los receptores Flk-1/KDR, produciría la diferenciación, multiplicación y migración de las células endoteliales; el VEGF al unirse a los receptores Flt-1, no tiene acción mitogena, pero juega un papel fundamental en la organización y maduración de los vasos neoformados. Embriones de ratones a los

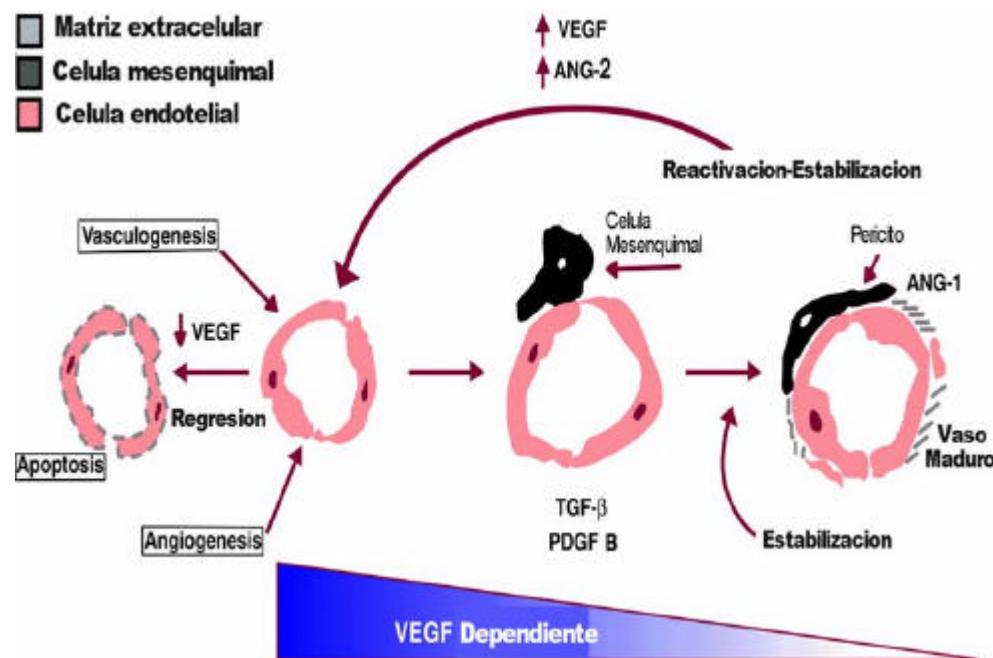
que se les priva genéticamente de receptores Flk-1/KDR, mueren por falta de vasculogenesis. En cambio embriones que teniendo receptores Flk-1/KDR pero que carecen de receptores Flt-1, si desarrollan cordones de células endoteliales, pero son incapaces de formar canales vasculares(131,132).

Los otros receptores endoteliales conocidos son:

Tie-1

Tie-2/Tek

A los receptores Tie-1, no se les conoce actualmente ligando. Los ligando de los receptores Tie-2/Tek son las angiopoyetinas 1 y 2, con acciones diferenciadas; mientras que la angiopoyetina 1 al unirse al receptor Tie-2, induciría a las células mesenquimales a su diferenciación en pericitos y células musculares lisas, completando la maduración y estabilización de los vasos recién formados; la angiopoyetina-2 también contribuye a esta maduración, pero solo en presencia de VEGF; en ausencia de este, se produce la regresión y destrucción de los vasos neoformados(133,134) Fig(7 y 9)



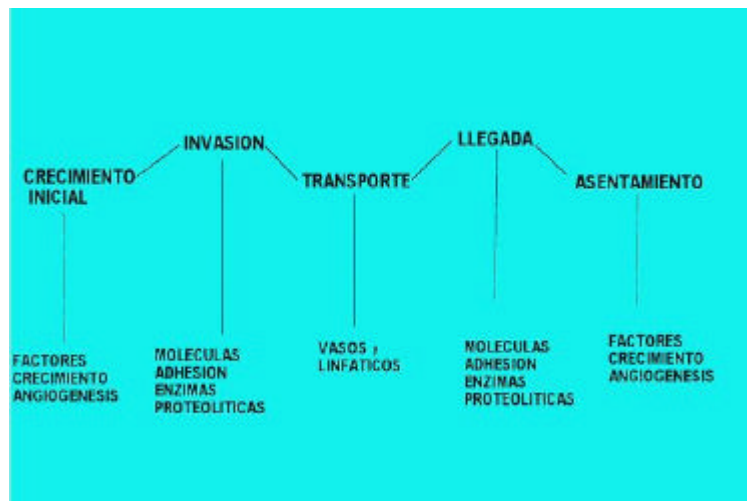
HIPOTESIS

En los pacientes de cáncer colorrectal, la recidiva y el desarrollo de metástasis a distancia, es el determinante del éxito o fracaso del tratamiento.

El conocimiento actual sobre el crecimiento, desarrollo y capacidad metastásica del cáncer colorrectal, implican en la fase de crecimiento inicial y asentamiento, a una serie de factores que han sido analizados en la introducción y entre los que resaltamos (Fig.1):

♦ Factores de crecimiento

♦ Angiogenesis



La mutación del p53, aparece en un 70-80% del cáncer colorrectal y se encuentra implicado en la secuencia y transición de adenoma a carcinoma invasivo. Así mismo es conocida su participación en la activación de la angiogenesis.

La angiogenesis por su parte es imprescindible para el crecimiento, desarrollo y capacidad metastásica del cáncer colorrectal.

Por lo tanto del estudio del p53 y la capacidad angiogenica del cáncer colorrectal, se podría perfilar, un fenotipo de cáncer con mayor agresividad local, capacidad de crecimiento y poder metastásico.

De lo anteriormente expuesto se podría inferir:

- ◆ Que en el cáncer colorrectal deberíamos encontrar un elevado porcentaje de mutación del p53.
- ◆ Que algunos pacientes expresen una mayor capacidad angiogenica, cuantificada por niveles sericos de VEGF y densidad de microvasos(MVD).
- ◆ Que si las alteraciones del p53, son responsables en alguna medida de la capacidad angiogenica, deberíamos encontrar algún tipo de relación entre estas alteraciones del p53, los niveles de VEGF y la densidad de microvasos.
- ◆ Que si la angiogenesis desempeña un papel importante en el crecimiento, desarrollo y capacidad metastasica; aquellos pacientes con tumores que expresen una mayor capacidad angiogenica, podrían reflejarlo en el índice de recidiva local y mortalidad.

OBJETIVOS

En función de las hipótesis formuladas, nos proponemos realizar, en pacientes con cáncer colorrectal estudios de:

♦ Alteraciones del p53. Lo que realizaremos mediante determinaciones de proteína mutante en especímenes de carcinomas colorrectales resecados.

♦ Angiogenesis. La capacidad angiogenica la cuantificaremos mediante el VEGF sérico y la densidad de microvasos(MVD) en tejido de tumores resecados.

Marcandonos los siguientes objetivos:

- 1) Determinar si las alteraciones del p53 condicionan el fenotipo angiogenico,
- 2) Determinar si existe o no relación, entre las alteraciones del p53, estado angiogenico y factores pronostico: ♦ Estadío Astler-Coller
 - ♦ Diferenciación celular
 - ♦ Afectación ganglionar
- 3) Determinar si existe relación o no entre las alteraciones del p53 y estado angiogenico con la recidiva tumoral y la mortalidad.

MATERIAL Y METODO

Pacientes.- El estudio ha sido realizado sobre 52 pacientes consecutivos de cáncer colorrectal. La fecha de inicio es 1 de Enero del 99 y la fecha de conclusión 31 Enero del 2001.

Todos los pacientes han sido documentados según protocolo del Servicio de Cirugía que incluye:

- Historia clínica

- Exploración física

- Analítica estandar

- Determinación de CEA preoperatorio

- Colonoscopia y biopsia

- Ecografía y/o Tac

Ningún paciente recibe radioterapia preoperatoria. Todos los pacientes han sido intervenidos y resecados aún con carácter paliativo.

La clasificación anatomopatológica seguida es la de Astler-Coller.

En nuestro hospital, los pacientes con grado igual o superior a B₂ , reciben tratamiento coadyuvante.

El seguimiento durante el primer año se realiza con una periodicidad trimestral e incluye:

- Anamnesis y exploración física

- Analítica estandar y CEA

- Ecografía

- Colonoscopia y TAC cada 6 meses

Durante el segundo año la periodicidad es semestral.

En esta serie de 52 pacientes, además se han obtenido muestras sericas pre y postoperatorias para la determinación del VEGF. Se han tomado muestras sericas a 16 sujetos sanos utilizados como control para la determinación del VEGF.

En las piezas anatomopatológicas obtenidas, además del estadiaje se informa del grado de diferenciación celular, con dos grados posibles: bien diferenciado y mal diferenciado o indiferenciado. Como determinaciones específicas de este estudio se han analizado el p53 y la densidad de microvasos(MVD), con metodología que se detalla a continuación.

P53.- La inactivación por mutación del gen p53, origina una proteína anómala denominada p53 mutante, que tiene una vida media mayor que la nativa, p53 salvaje, y detectable mediante técnicas de inmunohistoquímica.(135,136)

Técnica.- La muestra de tejido fijada con formol, se incuban con anticuerpos monoclonales anti-p53 clon DO7(Dako^R), prediluido durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente son procesados mediante el método Envisión. Los resultados se expresan cuantitativamente; en nuestros casos los valores van desde 0 a 95, según el porcentaje de núcleos teñidos.

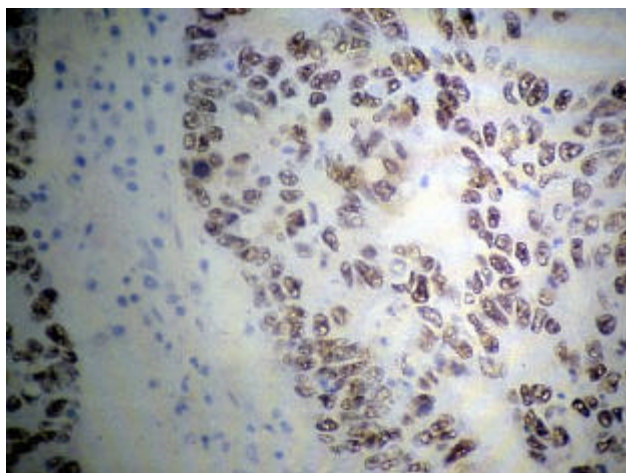


Foto 1 (Elevado porcentaje de tinción nuclear)

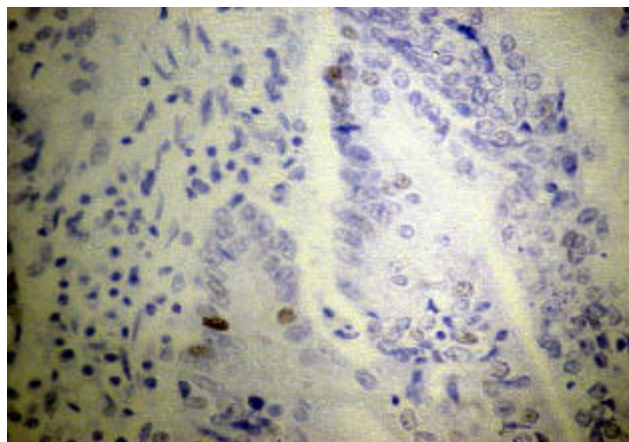


Foto2 (Escaso porcentaje de tinción nuclear)

VEGF.- Se obtuvieron muestras sericas pre y postoperatorias en los 52 pacientes objeto de nuestro estudio. Y se utilizaron muestras sericas de 16 sujetos sanos tomados como controles.

El VEGF serico se determinó mediante el procedimiento Quantikine (R&D System Inc., Miieapolis, MN), enzimoimonoensayo secuencial en dos fases de amplificación tipo "sándwich", heterogéneo, cuya fase sólida es tipo microplaca constituida por pocillos recubiertos de anticuerpo monoclonal anti-VEGF(anticuerpo de captura) y como anticuerpo marcado, anticuerpo policlonal anti-VEGF unido a peroxidasa de rábano. Las placas se leyeron mediante un lector Boehlisa(Ingelheim Diagnostica y Tegnología S.A., Barcelona, Spain).

Los resultados son de tipo cuantitativo y se expresan en picogramos por mililitro.

Densidad de microvasos(MVD).- Las muestras de tejido de los 52 adenocarcinomas se sometieron a tinción inmunohistoquímica con CD34, específico para las células endoteliales.

Se cuantifica el número de vasos en las zonas perifericas del tumor, mediante un programa de imagen digital, Leica 500IW.

Con la lupa se seleccionan las zonas periféricas del tumor que muestran una mayor cantidad de microvasos y a continuación con un aumento mayor (AD*200), se cuantifica el número de vasos en 14 campos de 73101 micras cuadradas cada uno; midiendo un total de 1.02 cm² de área tumoral.

Se incluyen como vasos neoformados: células endoteliales aisladas o en grupos, se identifique o no luz central y se excluyen aquellos con un calibre superior al área ocupada por 8 hematíes; así como los que poseen capa muscular, todo ello siguiendo los criterios descritos por Weidner(137).

Todas las mediciones han sido realizadas por un solo patólogo en condiciones adecuadas. Para obtener la validez intraobservador, se volvieron a medir un 10% de los casos, no observándose diferencias significativas.

Las cifras para cada campo se expresan en número absoluto de vasos por 73101 micras cuadradas. Se obtiene la media de los catorce campos como resultado final para cada caso.

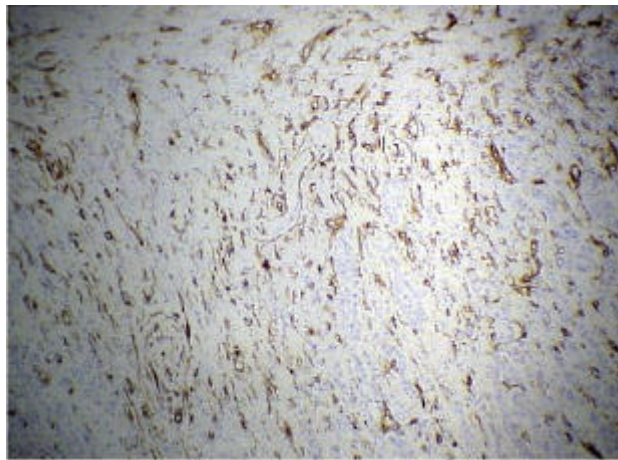


Foto 3 (Tinción intensa de CD-34)

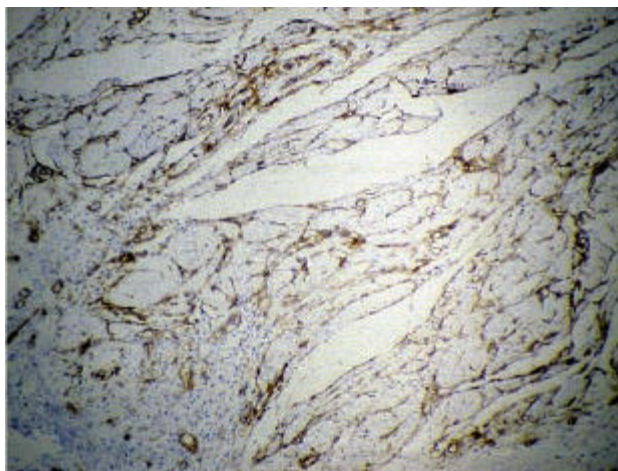


Foto 4 (Tinción intensa CD-34 a mayor aumento)

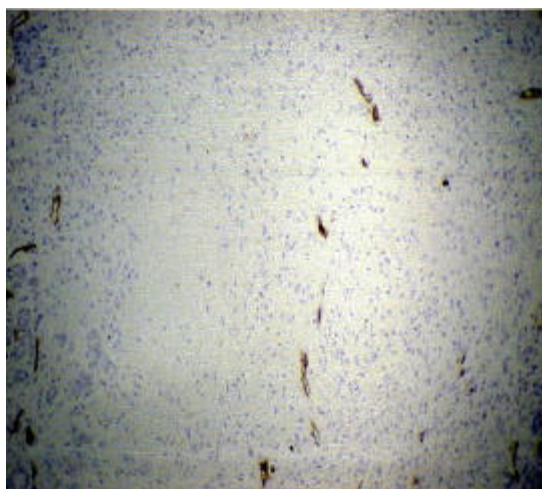


Foto 5 (Tinción débil CD-34)

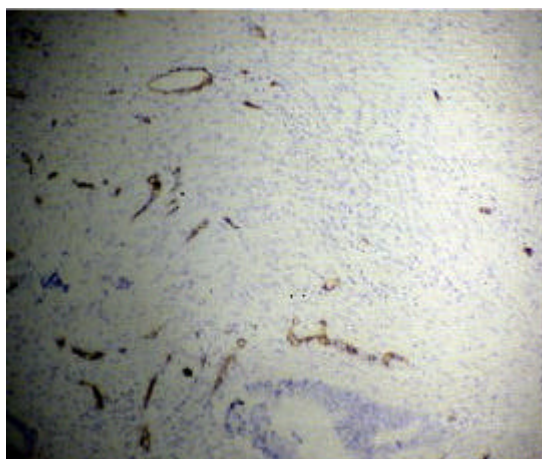


Foto 6 (Tinción débil CD-34 a mayor aumento)

Método estadístico.- Para el análisis de los datos se ha utilizado el paquete informático SPSSTM versión 8 para Windows(SPSS Inc., Chicago,IL).

RESULTADOS

La serie objeto del estudio se compone de 52 pacientes: 27 hombres y 25 mujeres. Con edades comprendidas entre 45 y 78 años y que a efectos estadísticos hemos dividido dicotomicamente en menores de 50 y mayores de 50 años.

En el 61.5% la localización del tumor era el colon y en el resto, 38.5% el tumor era de recto.

El tamaño tumoral superaba los 5 cm. en un 27%.

Un 83% de los pacientes presentaban tumores en estadios avanzados y solo un 17% presentaban estadios iniciales A y B₁. Seis pacientes (11.5%) tenían metástasis hepáticas en el momento del diagnóstico.

<i>Parámetro</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
<i>Sexo hombre</i>	27	51.9
<i>mujer</i>	25	48.1
<i>Edad =<50</i>	5	9.6
<i>>50</i>	47	90.4
<i>Estadio A</i>	2	3.8
<i>B₁</i>	7	13.5
<i>B₂</i>	22	42.3
<i>C₁</i>	2	3.8
<i>C₂</i>	13	25
<i>D</i>	6	11.5
<i>Localización Colon derecho</i>	14	26.9
<i>Colon izquierdo</i>	11	21.1
<i>Sigma</i>	7	13.5
<i>Recto</i>	20	38.5
<i>Tamaño 0-5 cm</i>	38	73.1
<i>>5 cm</i>	14	26.9
<i>Diferenciación Bien diferenciados</i>	24	46.2
<i>Mal diferenciados</i>	28	53.8
<i>Metástasis No</i>	46	88.5
<i>Sí</i>	6	11.5

El tiempo de seguimiento ha sido de 23 meses, al cabo de los cuales, 15 pacientes han presentado recidiva (28.8%) y 13 pacientes han fallecido como consecuencia de su tumor (25%). Tabla 2

	<i>n</i>	<i>%</i>
<i>Recidiva no</i>	31	67.39
<i>sí</i>	15	32.61
<i>Mortalidad no</i>	39	75
<i>sí</i>	13	25

P53.- El 75% de los tumores presentaban un p53 positivo frente a un 25% que resultó negativo. Puesto que el análisis de la muestra, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, no muestra significación, asumimos que la distribución de la muestra no es normal y en consecuencia utilizaremos pruebas no paramétricas.

En primer lugar y para saber si existe algún tipo de relación, entre los valores del p53 con los del VEGF pre y postoperatorio y del MVD, utilizamos el test de Wilcoxon, sin que obtuviéramos diferencias significativas:

TEST ESTADÍSTICOS^b

a Basado en rangos negativos

b test de Wilcoxon

Utilizando test de correlación bivariada de Kendall taub y de Spearman, tampoco se obtuvo significación.

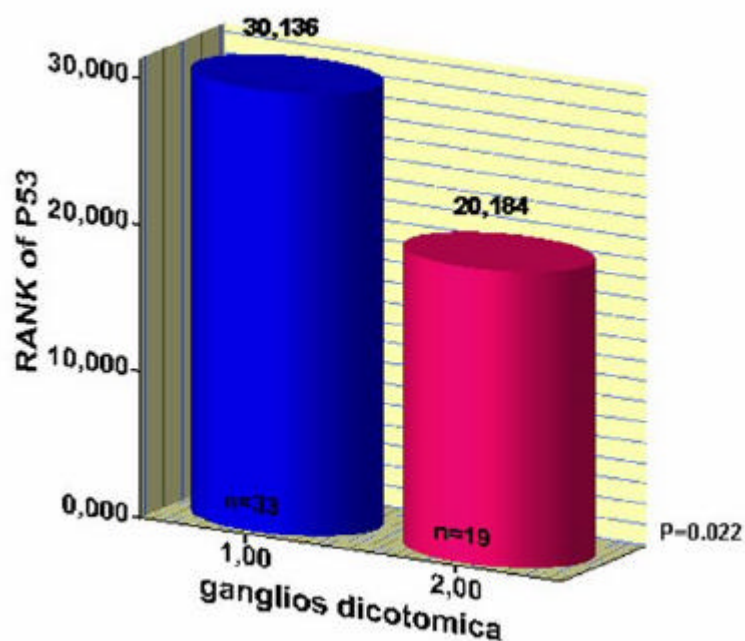
El posible poder predictivo de los valores del p53 sobre los valores del VEGF y del MVD, utilizando modelos de regresión lineal, tampoco ha podido ser demostrado; con $p= 0.768$ para el VEGF preoperatorio, $p= 0.575$ para el VEGF postoperatorio y de $p= 0.948$ para el MVD.

En el segundo bloque analítico, queremos estudiar las posibles relaciones del p53 con las variables que pueden tener valor pronóstico, como son: estadiaje, grado de diferenciación, ganglios negativos y positivos, recidiva y mortalidad.

Para el estadiaje, hemos utilizado la prueba de Mann-Whitney, que compara los rangos del p53 de dos grupos de estadios: A y B₁ y B₂, C₁,C₂ y D. No obteniendo diferencias significativas con $p=0.942$.

Para el grado de diferenciación hacemos dos grupos: bien diferenciados y pobre o mal diferenciados; la comparación de rangos de p53 de estos grupos tampoco nos dan diferencias significativas $p=0.108$.

La comparación de rangos del p53 en pacientes con ganglios negativos y ganglios positivos, si muestra diferencias significativas con **$p=0.022$** , en el test de Mann-Whitney.

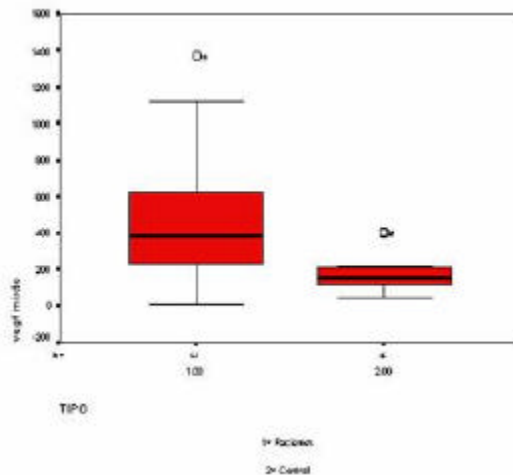


Mediante un modelo de regresión logística univariante entre el p53 y ganglios dicotómica, el p53 clasificaría correctamente al 84.8% de los casos con ganglios negativos y al 42% de los casos con ganglios positivos.

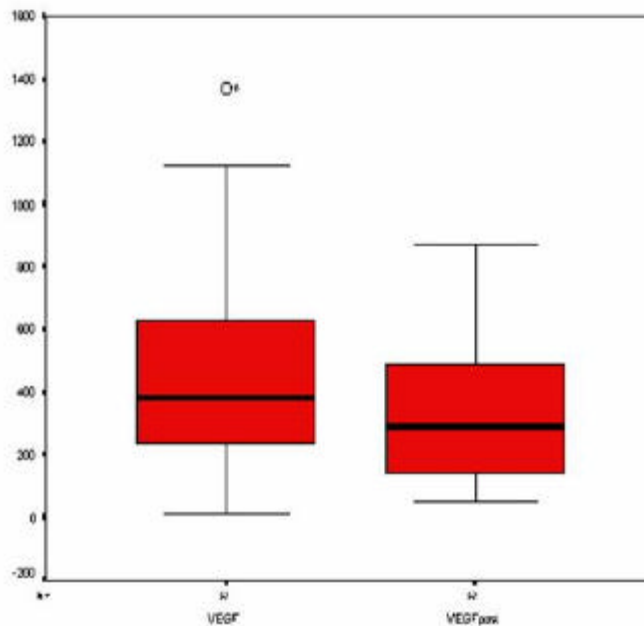
El análisis mediante regresión de Cox univariante entre el P53 y la recidiva, no muestra significación, con $p=0.0729$.

Al analizar la relación entre el p53 y la mortalidad, mediante regresión de Cox tanto uni como multivariante, no obtenemos significación alguna con $p=0.640$ y $p=0.846$.

VEGF.- El primer análisis estadístico, es para comprobar si el VEGF sérico en pacientes con cáncer colorrectal, difiere de los valores encontrados en sujetos control. Como la distribución de la muestra no es normal utilizaremos pruebas no paramétricas, en este caso el test de Mann-Whitney para dos muestras independientes, con $p=0.0000$, lo que nos confirma la ausencia de significación.

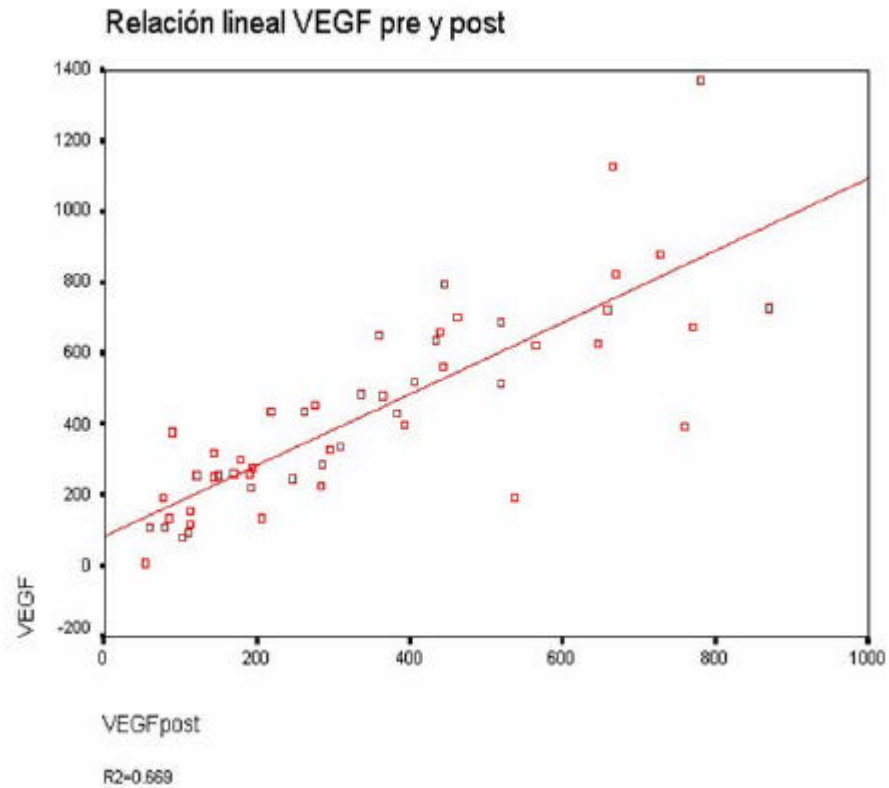


Al analizar los valores de VEGF pre y postoperatorio, mediante prueba de muestras relacionadas, no encontramos significación $p=0.0000$.



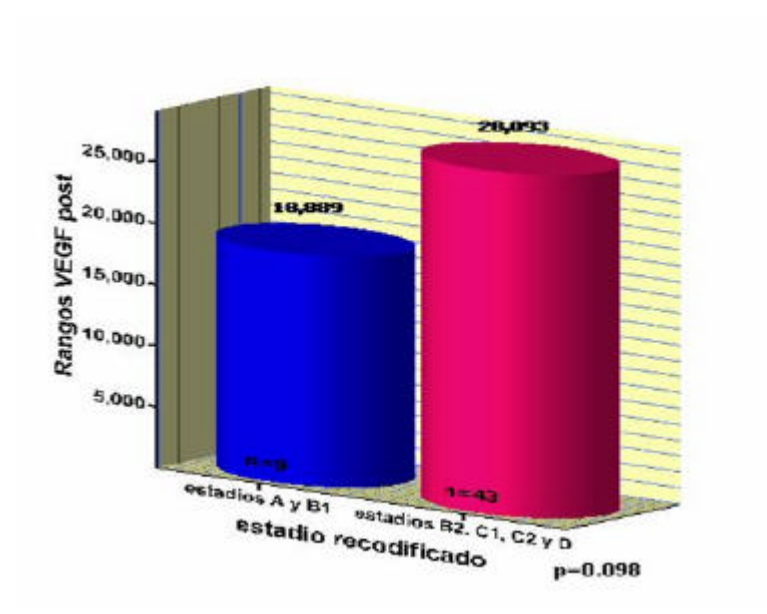
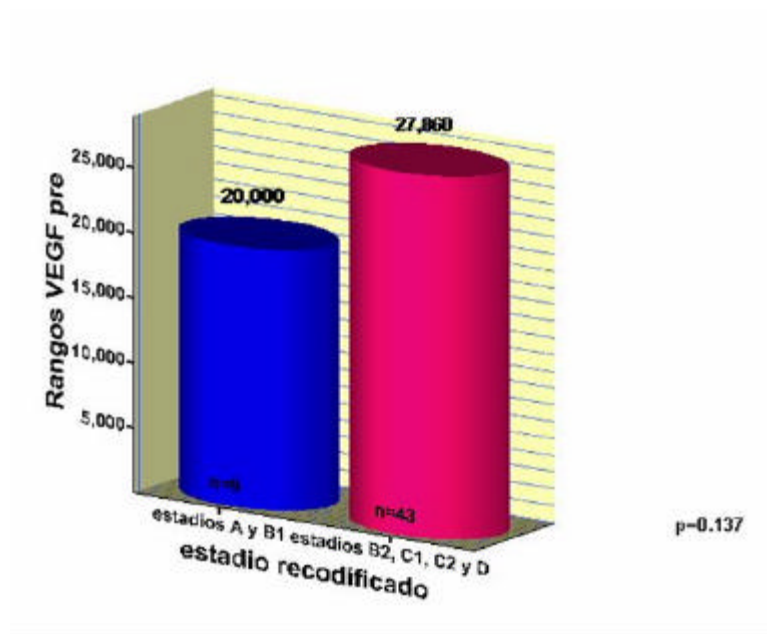
Para ver el grado de relación entre estas dos variables, utilizamos pruebas de correlación bivariada para un contraste bilateral, tanto en prueba paramétrica (coeficiente de Pearson) como en no paramétricas (correlación de Spearman), muestran valores altos, 0.818 y 0.851 respectivamente, lo que se interpreta como correlaciones significativas a nivel de 0.01.

Para ver el tipo de relación, utilizamos prueba de regresión lineal, que nos muestra un coeficiente de determinación de 0.669 ($R^2=0.669$), lo que nos permite decir que la variación del valor del VEGF postoperatorio, es explicada en un 67% por los valores del VEGF preoperatorio.

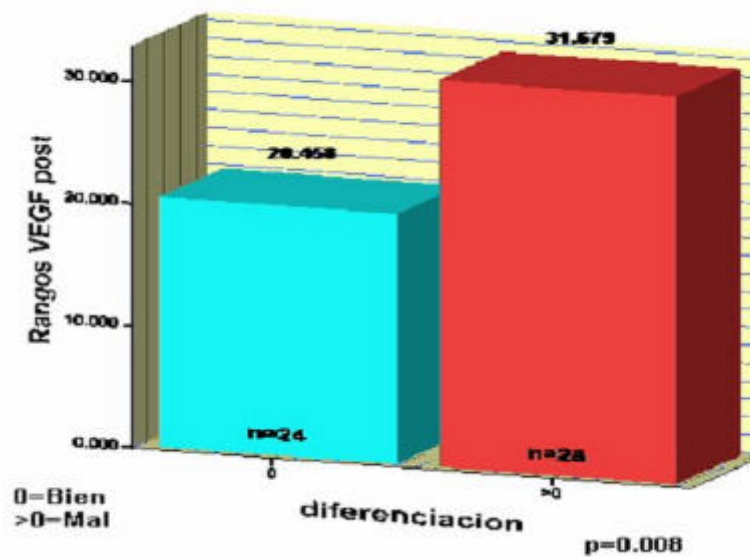
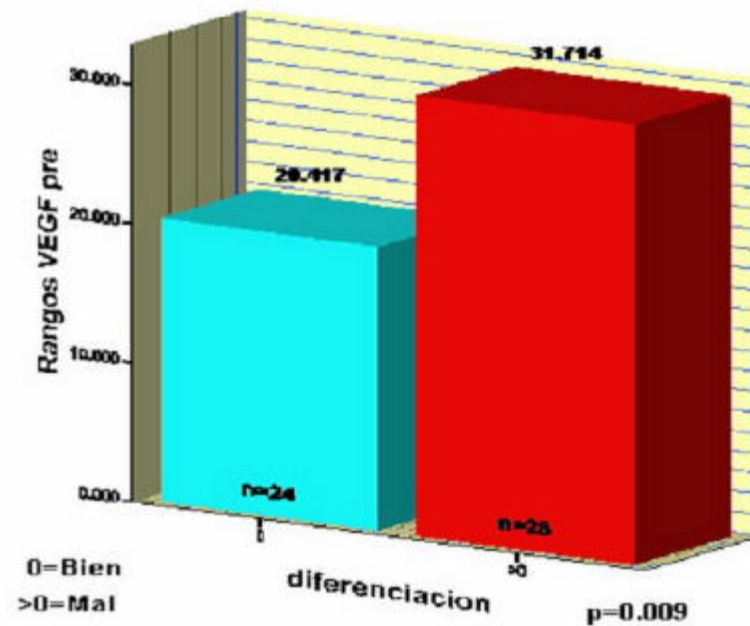


Al igual que con el p53 nos proponemos estudiar la posible relación entre los valores de VEGF pre y postoperatorio con las variables con cierto valor pronóstico: estadiaje, diferenciación tumoral, ganglios positivos y negativos, recidiva y mortalidad.

En la comparación de los rangos de VEGF pre y postoperatorio, entre los pacientes con estadios A y B₁ y B₂, C₁, C₂ y D, aunque apreciamos diferencias estas no son significativas; $p=0.137$ y $p=0.098$.

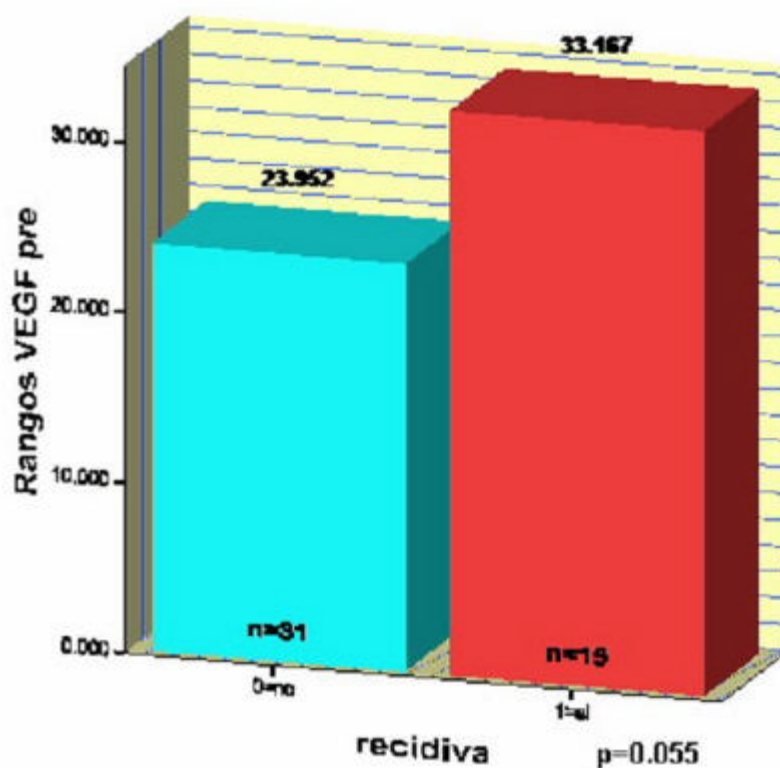


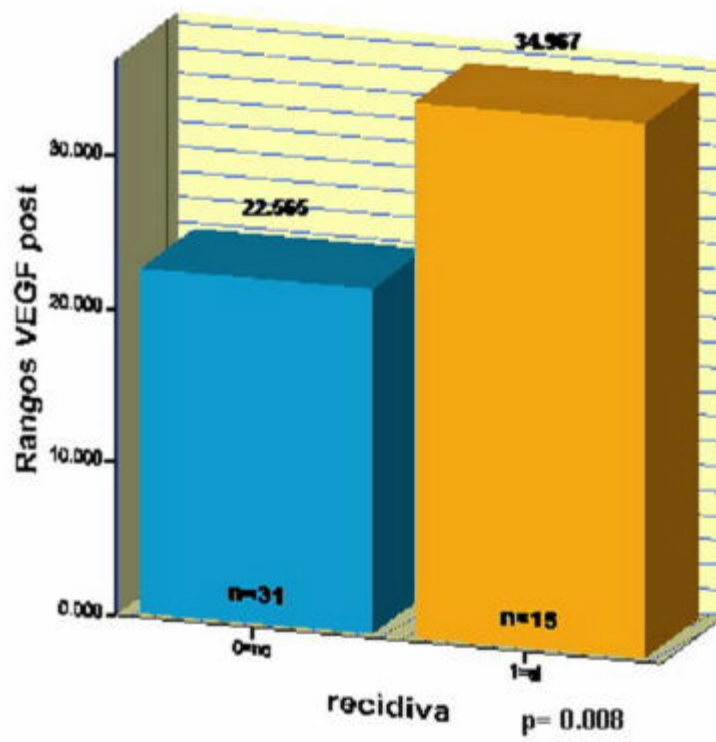
Los rangos de VEGF pre y postoperatorio, de los pacientes con tumores bien diferenciados, difieren significativamente del de los pacientes con tumores moderada o mal diferenciados, con $p=0.009$ y $p=0.008$ respectivamente.



Por el contrario no hemos encontrado diferencias significativas entre los rangos de VEGF pre y postoperatorio de los pacientes con ganglios negativos y los pacientes con ganglios positivos: $p=0.162$ y $p=0.231$ respectivamente.

Al comparar los rangos de VEGF pre y postoperatorio de los pacientes sin y con recidiva, encontramos valores próximos a la significación para el VEGF preoperatorio, $p=0.055$ y claramente significativos para los del VEGF postoperatorio **$p=0.008$** .





Aplicando pruebas de regresión logística, en la que la variable dependiente sea la recidiva, el VEGF postoperatorio se muestra significativo con **p=0.027**, no sucede lo mismo con el VEGF preoperatorio con $p=0.348$. Según este modelo, el VEGF postoperatorio, clasificaría correctamente al 87% de los pacientes que no van a presentar recidiva, pero solo al 33% de los que si van a tenerla.

Cuando estudiamos la relación entre la recidiva, mediante análisis de regresión de Cox multivariante, en el que además del VEGF pre y postoperatorio incluimos al p53 y el MVD, los niveles de significación aumentan tanto para el VEGF pre como postoperatorio: **p=0.046** para el VEGF preoperatorio y **p=0.001** para el VEGF postoperatorio.

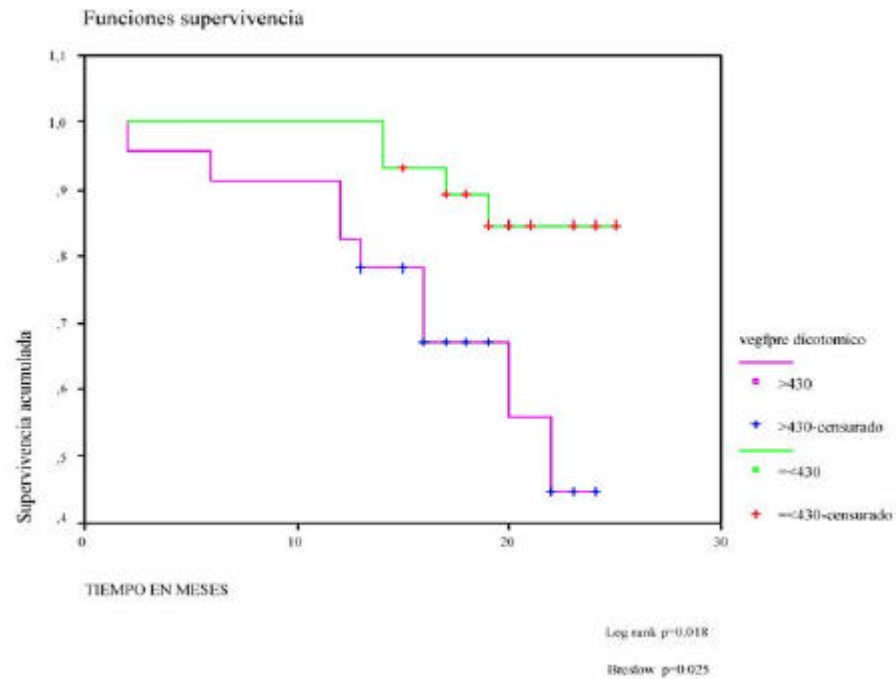
Cuando comparamos los rangos de VEGF pre y postoperatorio de los pacientes que sobreviven y de los que han fallecido, no obtenemos significación: $p=0.315$ y $p=0.060$ respectivamente. Cuando comparamos las medias del VEGF postoperatorio de los pacientes que han fallecido y los que no, si encontramos diferencias significativas: **p=0.019**.

Aplicando modelo de regresión logística, para el análisis de la mortalidad, comprobamos que el VEGF preoperatorio carece de significación: $p=0.230$, pero el VEGF postoperatorio se muestra significativo: **p=0.025**. Según este modelo, el VEGF postoperatorio clasificaría correctamente el 95% de los pacientes que sobreviven, aunque solo clasifica bien al 23% de los que han fallecido.

Utilizando prueba de regresión de Cox, respecto de los pacientes que han fallecido durante los 23 meses de seguimiento, en relación con sus valores de VEGF pre y postoperatorio, obtenemos significación para ambos: **p=0.05** y **p=0.001**. El punto de corte optimo en los niveles de VEGF pre y postoperatorio es de 430 y 343, par los cuales el Chi-cuadrado, de esta regresión de Cox, es máximo.

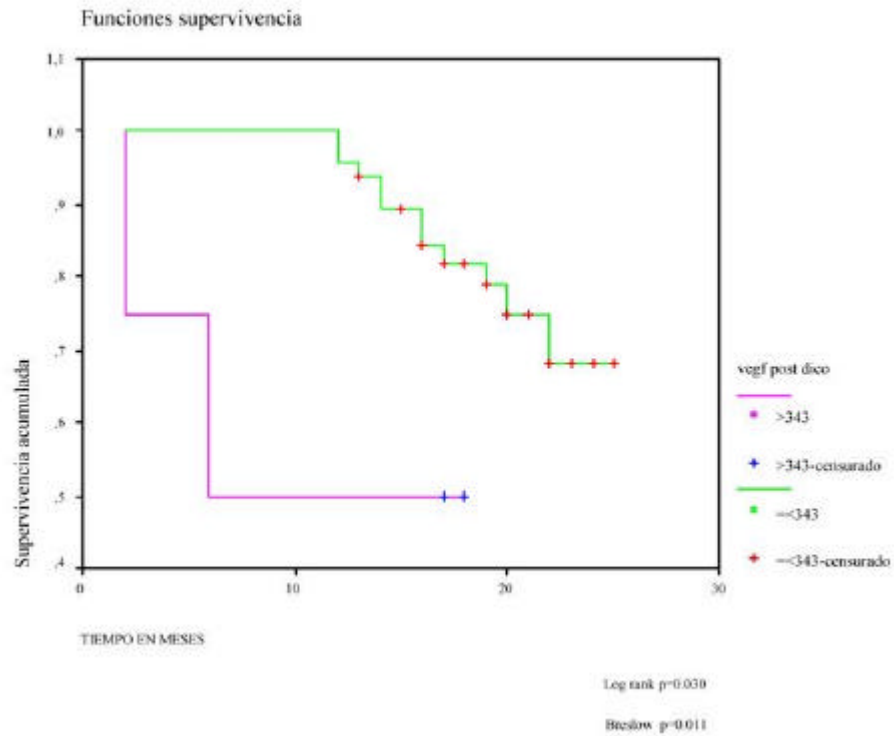
Cuando analizamos la supervivencia mediante curva de Kaplan-Meier, con respecto al valor del VEGF preoperatorio, tomado dicotomicamente con valores mayor y menor a

430, obtenemos significación tanto para el log rank como par el Breslow: **p=0.018** y



p=0.25.

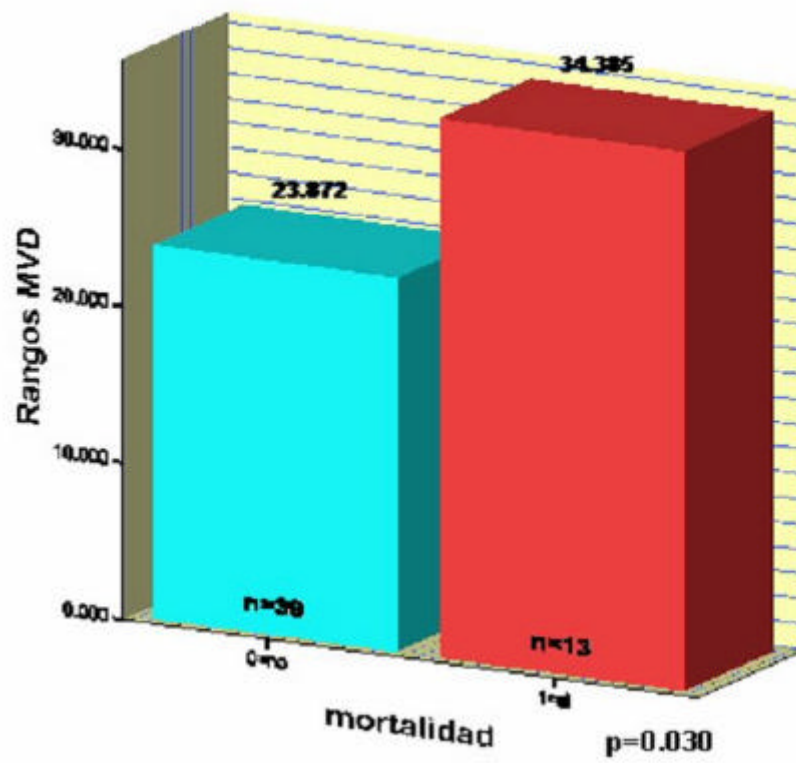
Cuando analizamos la supervivencia mediante un modelo de Kaplan-Meier, con respecto al valor del VEGF postoperatorio tomado dicotomicamente con valores menor y mayor a 343, obtenemos significación tanto para el Log rank como para el Breslow: **p=0.030** y **p=0.011**.



MVD.- Al igual que con el p53 y el VEGF, hemos realizado análisis estadísticos, del MVD con las variables: estadiaje, diferenciación, ganglios, recidiva y mortalidad.

	<i>VEGF- P53</i>	<i>MVD- P53</i>	<i>VEGFpost- P53</i>
<i>Z</i>	-6.275 ^a	-6.275 ^a	-6.275 ^a
<i>Sig.asintót.(bilateral)</i>	.000	.000	.000

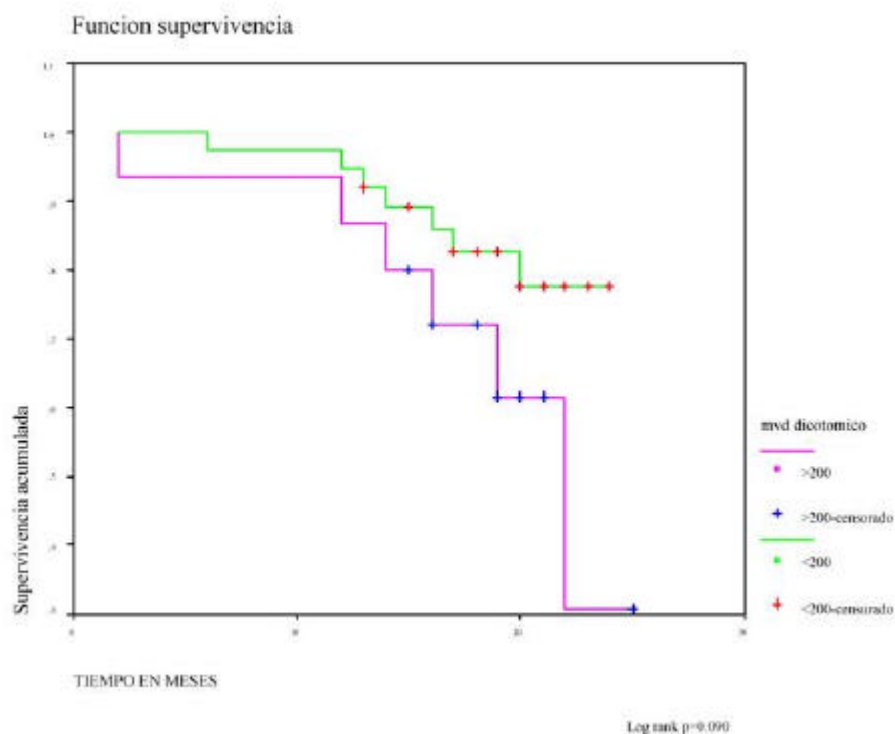
Como vemos el MVD solo ofrece significación en relación con la mortalidad.



En análisis de regresión logística univariante respecto a la mortalidad, el MVD muestra una significación de **p=0.041**; niveles de significación que aumentan a **p=0.024**, cuando el análisis es multivariante junto con el p53 y el VEGF pre y postoperatorio. Según este modelo, se clasificarían correctamente el 92% de los pacientes que continúan vivos y el 38% de los fallecidos.

El análisis mediante regresión de Cox, de los pacientes que han fallecido durante los 23 meses de seguimiento, con respecto al MVD, muestra una significación con **p=0.023**, en prueba univariante; nivel de significación que es de **p=0.007**, cuando la prueba es multivariante, junto con el p53 y el VEGF pre y postoperatorio. Con una relación de disparidad de 1.005. Lo que significa, que por cada punto que aumente el MVD, la mortalidad aumentará 1.005.

El análisis de la supervivencia mediante el modelo de Kaplan-Meier, en función del MVD, tomado este dicotómicamente con valores inferiores y superiores a 196, nos da una significación de $p=0.090$ del log rank.



Por último analizamos la posible relación de: edad, sexo, valores de CEA preoperatorio, valores de CEA postoperatorio y valores CA 19-9; con las mismas variables que hemos venido comparando esto es: estadiaje, grado de diferenciación, ganglios, recidiva y mortalidad.

	<i>Estadiaje</i>	<i>Diferenciación</i>	<i>Ganglios</i>	<i>Recidiva</i>	<i>Mortalidad</i>
MVD	P=0.171 n.s	P=0.811 n.s	P=0.372 n.s	P=0.806 n.s	P=0.030

En vista de estos resultados, creamos un modelo de regresión logística multivariante, con la recidiva como variable dependiente y como variables independientes: CEA pre y postoperatorio, CA 19-9, p53, VEGF pre y postoperatorio y MVD; observando que solo el VEGF postoperatorio es significativo: **p=0.033**. Según este modelo clasificaríamos correctamente al 87% de los pacientes sin recidiva y al 66.6% de los pacientes con recidiva. Este mismo modelo de regresión logística, pero con la mortalidad como variable dependiente, identifica al VEGF postoperatorio y al MVD como únicas variables independientes con significación: **p=0.025** y **p=0.018** respectivamente. Este modelo clasificaría correctamente al 94.8% de los pacientes que sobreviven y al 69% de los pacientes que han fallecido.

Comparativamente, si utilizamos un modelo de regresión logística, en el que la variable dependiente sea la recidiva y como variables independientes, introducimos el marcador tumoral CEA pre y postoperatorio y además el CA 19-9; no obtenemos significación para dichas variables. Este modelo clasificaría bien al 93.5% de los pacientes sin recidiva y solo al 20% de los que tienen recidiva.

Este mismo modelo de regresión, en el que la variable dependiente sea la mortalidad, tampoco confiere ninguna significación a las variables independientes (CEA pre y post y CA

19-9. Según este modelo se clasificarían correctamente el 100% de los pacientes que no han fallecido, pero solo el 38-4% de los que han fallecido.

	<i>Estadía</i>	<i>Diferenciación</i>	<i>Ganglios</i>	<i>Recidiva</i>	<i>Mortalidad</i>
Edad	n.s	n.s	p=0.002	n.s	n.s
Sexo	n.s	n.s	n.s	n.s	p=0.017
CEA pre	n.s	n.s	n.s	p=0.030	p=0.005
CEA post	n.s	n.s	n.s	p=0.005	n.s
CA 19-9	n.s	n.s	p=0.032	p=0.024	p=0.047

Utilizando modelo de regresión de Cox, con la recidiva como variable dependiente y como variables independientes: CEA pre y postoperatorio, CA 19-9, p53, VEGF pre y postoperatorio y MVD; la única variable independiente que muestra significación es el VEGF postoperatorio: **p=0.014**. Este mismo modelo pero con la mortalidad como variable dependiente, señala como variables independientes con significación: CEA pre y postoperatorio, VEGF postoperatorio y MVD.

	% correcto no recidiva	% correcto recidiva	% global	%correcto no fallecidos	% correcto fallecidos	% global
<i>Modelo</i> <i>P53,vegf,mvd</i> <i>CEA, CA19.9</i>	87.1	66.67	80.4	94.87	69.23	88.46
<i>Modelo</i> <i>CEA pre y</i> <i>post</i> <i>CA 19.9</i>	93.55	20	69.57	100	38.46	84.62

DISCUSIÓN

P53.-

La importancia y justificación del estado del p53 en pacientes afectos de carcinoma colorrectal, en parte reseñada en la introducción, la basamos:

- ♦ La mutación del p53 aparece elevada en este tipo de tumores.
- ♦ La mutación del p53 está implicada en la secuencia adenoma carcinoma.
- ♦ La mutación del p53 se considera como un factor importante en la angiogenesis tumoral
- ♦ A la mutación del p53 se le atribuye significación pronóstica en el cáncer colorrectal.

En nuestro estudio , la mutación del p53 la encontramos en el 75% de los pacientes y aunque ligeramente elevada, coincide con la reportada por otros autores(12).

Varios autores han comunicado la relación positiva entre la mutación del p53 y el estado angigenico tumoral(93,103,104,138,139,140). Nosotros no hemos encontrado este tipo de relación, coincidiendo con lo comunicado por otros autores (141,142,143). Sabemos que la regulación de la angiogenesis es un proceso complejo, donde intervienen protooncogenes, genes supresores como el p53 y además factores tisulares como son la hipoxia, acidosis etc. Así mismo sabemos que una vez " conectado " el interruptor angigenico, es el propio tumor el que de una forma autocrina y paracrina, puede perpetuar el estímulo angigenico. De forma que sería factible encontrar tumores con elevados niveles de VEGF y gran densidad de microvasos, independientemente del estado del p53.

La significación pronóstica de la delección del p53 ha sido ampliamente comunicada (144-148) . En nuestra serie, no hemos encontrado relación alguna entre la proteína resultante de la mutación del p53, estadiaje, grado de diferenciación tumoral, índice de recidiva y supervivencia. El único de tipo de relación encontrado entre el p53 y los factores pronóstico aceptados ha sido con la afectación ganglionar. Cuando este tipo de relación se estudia mediante regresión logística, con la variable ganglios tomada dicotómicamente en ganglios

positivos y negativos, obtenemos una diferencia significativa **p=0.048**. De forma que los valores del p53, clasificarían correctamente al 84% de los pacientes con ganglios negativos, pero solo clasificaría correctamente al 42% de los pacientes con ganglios positivos. Con una sensibilidad del 61% y una especificidad del 71%.

Al analizar la bibliografía de los trabajos que estudian la relación del p53 con los factores pronosticos del cáncer colorrectal, hemos encontrado diferencias metodologicas sustanciales. La mutación del p53 puede ser evaluada de una forma que podríamos considerara indirecta y que se basa en la cuantificación del deposito nuclear de proteina mutante, producto de la inactivación del p53, mediante técnicas de inmunohistoquímica(135,136), método seguido en nuestra serie. El otro método empleado, que podríamos considerar directo y más recientemente incorporado, es el estudio secuencial del DNA . Kressner y col.(18) comparando ambos métodos encuentran, que hasta un 29% de las mutaciones detectadas, mediante el análisis secuencial del DNA, resultan negativas mediante técnicas de inmunohistoquímica. Pero además mientras que, los análisis multivariantes de la supervivencia respecto al p53 estudiado por el metodo del DNA, resultan estadísticamente significativos, no lo son cuando el p53 ha sido cuantificado por métodos de inmunohistoquímica.

Por otra parte en los trabajos que utilizan determinación inmunohistoquímica, se aprecian variaciones de método: determinaciones en tejido en fresco, frente a los que las hacen en tejido fijado; utilización de anticuerpos diferentes. Pero sobretodo destaca la falta de uniformidad en la comunicación de los resultados: mientras que unos lo expresan cuantitativamente otros lo hacen de forma semicuantitativa. Todo ello hace difícil, cuando no imposible, la comparación directa entre los trabajos y por lo tanto la interpretación de los resultados. Conclusiones similares se desprenden de la reciente revisión llevada a cabo por Petersen y col.(173) sobre la significación del estado del p53 en el cancer colorrectal.

En resumen, en nuestra serie, la evaluación del p53 y su posible relación con el estado angiogenico tumoral y formulada como primera hipótesis de esta tesis no ha podido ser demostrada. Tampoco hemos encontrado que del estudio del p53, se obtenga información adicional sobre el pronostico de los pacientes con cáncer colorrectal.

VEGF.- Al estudiar los niveles sericos de VEGF en pacientes con cáncer colorrectal, el primer objetivo era averiguar, si dichos niveles diferían, de los encontrados en sujetos normales, como ha sido comunicado (149-152). Utilizando como control a 16 sujetos sanos, encontramos diferencias significativas en los niveles séricos de ambos grupos, pudiendo afirmar que los niveles de VEGF sérico se encuentran mas elevados en pacientes con cáncer colorrectal que en sujetos sanos.

La siguiente cuestión, era comprobar si los niveles de VEGF, descendían una vez extirpado el tumor, como han comunicado otros autores (150-153). El control efectuado en los dos primeros meses postoperatorios, confirma el descenso de los niveles séricos de VEGF y este descenso es estadísticamente significativo. El análisis de correlación nos da un índice de correlación $R^2 = 0.670$, que puede considerarse elevado. Esto nos lleva pensar que el tumor es la principal fuente y responsable de los niveles elevados de VEGF en estos pacientes.

El análisis estadístico mediante pruebas no paramétricas y de regresión, entre los valores de VEGF, tanto preoperatorio como postoperatorio, y la densidad de microvasos tumoral, no mostró ningún tipo de relación, en nuestra serie; no pudiendo confirmar lo comunicado por otros autores(149,152), que encuentran relación entre los niveles de VEGF y la densidad de microvasos. Si bien Yamamoto y col.(149) determinan el VEGF en suero y Davis y col.(152) lo hacen en plasma. La razón para utilizar plasma en lugar de suero es defendida también por Hyodo y col(154), al encontrar que los niveles séricos de VEGF, son mas altos que en plasma y que dicha elevación sería debida a la liberación de VEGF por parte de las plaquetas durante la formación del coagulo; motivo por el cual consideran estos autores, más

representativos los valores de VEGF plasmático que los séricos. En nuestra opinión, el método no es relevante y se trataría de una diferencia cuantitativa más que cualitativa, toda vez que se utilice siempre el mismo método.

Más importante resulta el hecho, que en nuestra serie, los niveles VEGF no se correlacionen con la densidad de microvasos del tumor; puesto que sí es un potente agente angiogenico, sería de esperar, que pacientes con elevados niveles de VEGF circulante, presentaran tumores más vascularizados y por lo tanto con mayor densidad de microvasos. Los motivos que justificarían esta aparente contradicción podrían deberse a:

- ♦ Los niveles de VEGF sérico, pueden no ser un fiel reflejo del VEGF tisular.
- ♦ Aunque el VEGF es un potente agente angiogenico, no es el único, como se ha reseñado en la introducción, y la densidad de microvasos tumoral no esté condicionada exclusivamente por el VEGF.
- ♦ La vascularización tumoral es muy heterogenea, variando de unas zonas a otras, coexistiendo, partes centrales mal vascularizadas con necrosis y otras perifericas con mayor vascularización. Aunque las muestras de tejidos para la determinación de la densidad de microvasos, suelen tomarse de zonas perifericas, la metodología no se encuentra estandarizada. Estas diferencias de método van desde la utilización de distintos anticuerpos para marcar las células endoteliales(Factor VIII, CD-34...), hasta el sistema de conteo de los microvasos. El método descrito por Weidner y col (137) es el más utilizado y el seguido en este estudio, pero es operador dependiente, por lo que se ha diseñado métodos morfométricos digitales(155), menos dependientes del observador. No obstante, el método ideal de valoración de la vascularización tumoral, está por desarrollarse.

VEGF y factores pronóstico.- Tanto los niveles pre y postoperatorio de VEGF se encuentran más elevados en pacientes con estadios avanzados(B₂,C₁, C₂ y D) que en pacientes con estadios A y B₁; si bien estas diferencias no son estadísticamente significativas: $p=0.137$ y $p=0.098$, lo que difiere de lo comunicado por otros autores(156). La

ausencia de significación creemos que se debe al tamaño de la muestra, toda vez que en nuestra serie solo 9 pacientes se clasificaron como estadios A y B₁.

Los niveles séricos de VEGF pre y postoperatorio, resultaron estar más elevados en pacientes con tumores moderada y mal diferenciados, que en pacientes cuyos tumores eran bien diferenciados. Y estas diferencias fueron estadísticamente significativas: **p=0.009** y **p=0.008**.

Por el contrario no hemos encontrado diferencias en los niveles de VEGF tanto pre como postoperatorio de los pacientes con y sin afectación ganglionar.

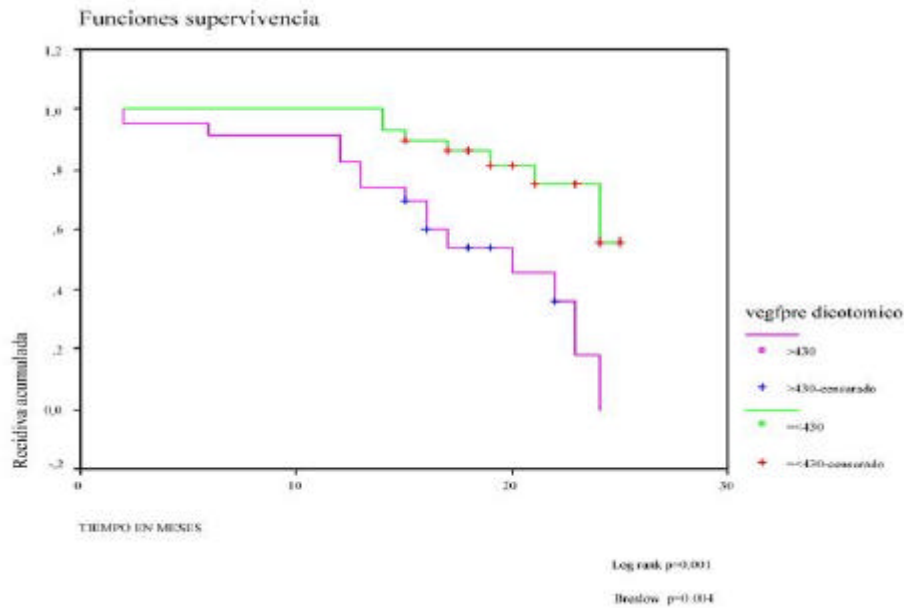
El análisis mediante pruebas no paramétricas, U de Mann-Whitney, de los pacientes con y sin recidiva, en relación a sus valores de VEGF pre y postoperatorio, muestran una clara significación estadística para los valores postoperatorios. **p=0.008** y próximos a la significación para los valores preoperatorios, p=0.055. Esta relación se confirma mediante análisis de regresión logística, en donde el VEGF postoperatorio alcanza significación con **p=0.027**, con un poder predictivo positivo del 33% y un poder predictivo negativo del 87%.

En un modelo de regresión logística con la recidiva como variable dependiente y los valores de VEGF pre y postoperatorio, p52 y MVD como variables independientes, solo los valores de VEGF postoperatorios muestran significación estadística: **p=0.026**, con un valor predictivo positivo del 53% y un poder predictivo negativo del 84%. La sensibilidad sería del 61% y la especificidad del 78%.

Si en este modelo incluimos, los valores de CEA pre y postoperatorio y de CEA 19-9, de nuevo los valores de VEGF postoperatorio se muestran como la única variable independiente con valor significativo: **p=0.033**; el valor predictivo positivo sube al 66% y el negativo al 87%, siendo su sensibilidad del 71% y con una especificidad del 84%.

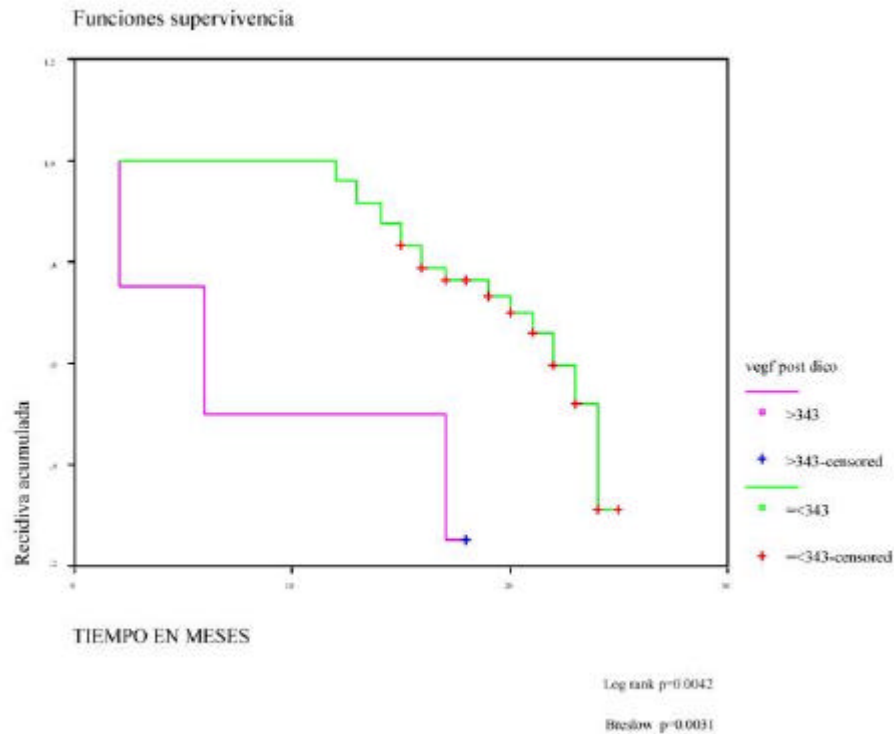
El análisis mediante regresión de Cox de la recidiva respecto a los valores del VEGF, muestra significación estadística tanto para el VEGF pre como postoperatorio: **p=0.029** y **p=0.0006**.

Si tomamos los valores de VEGF pre y postoperatorio dicotomicamente con puntos de corte, a partir de sus medias: 430 y 343 respectivamente; el análisis de Kaplan-Meier de la recidiva, respecto al VEGF preoperatorio dicotómico, se muestra significativo, con un log rank de **0.001** y Breslow de **0.004**.



Es decir que los pacientes cuyos valores de VEGF preoperatorio, se encuentren por encima de 430 pg/mL, tienen mayor posibilidad de recidivar, que aquellos cuyas cifras sean inferiores a 430 pg/mL.

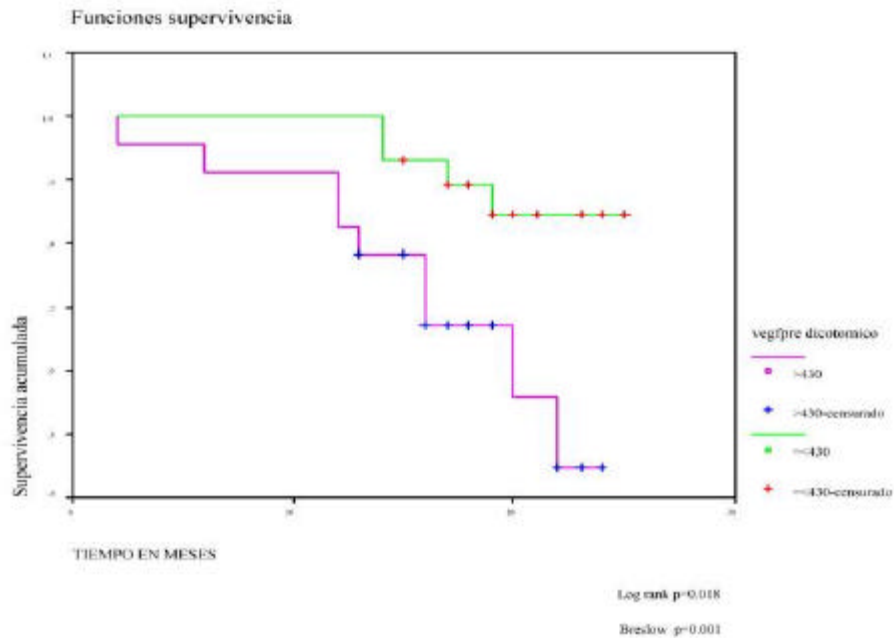
Del mismo modo el análisis de Kaplan-Meier de la recidiva respecto a los valores de VEGF postoperatorio dicotómico, tomado a partir de la media 343, también son estadísticamente significativos: log rank: **0.001** y Breslow: **0.003**.



De forma que los pacientes cuyos valores postoperatorios de VEGF se encuentren por encima de 343 pg/mL, van a tener más probabilidad de recidivar, que los pacientes cuyos valores de VEGF postoperatorio sean inferiores a 343 pg/mL.

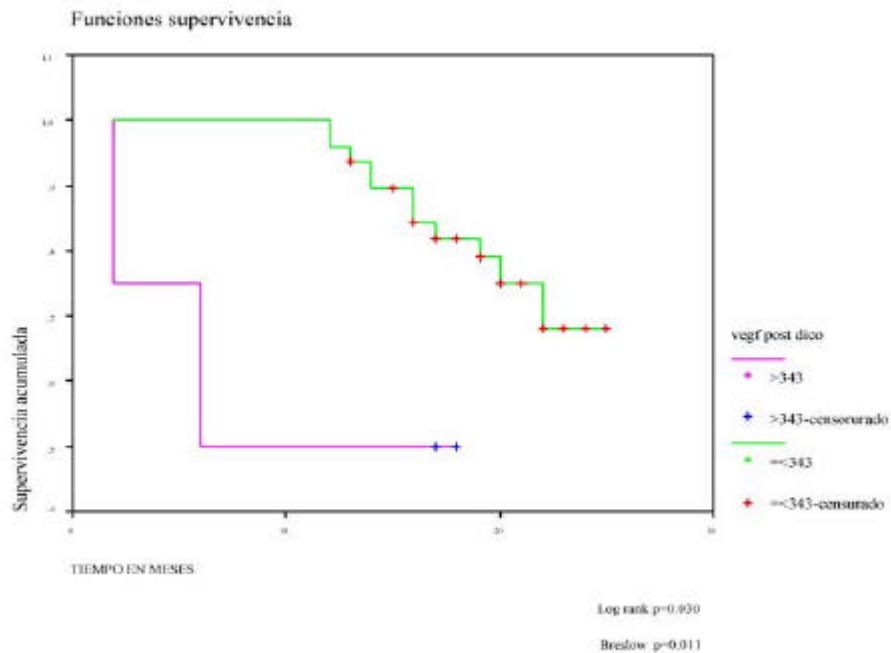
Respecto a la mortalidad, como se ha mencionado en los resultados, el análisis de regresión de Cox, muestra diferencias significativas tanto para el VEGF pre como postoperatorio: **p=0.05** y **p=0.001** .

La curva de supervivencia de Kaplan-Meier, para los valores de VEGF preoperatorio dicotomicos con referencia a la media, 430, nos muestra diferencias estadísticamente significativas con log rank: **0.018** y Breslow: **0.025** .



Es decir que los pacientes cuyos valores preoperatorios de VEGF sean superiores a 430 pg/mL, sobreviven menos que los que tienen valores inferiores a 430 pg/mL.

La curva de Kaplan-Meier de supervivencia, para los 23 meses de seguimiento, de los valores dicotomicos respecto a la media, 343, del VEGF postoperatorio, también son significativos; log rank: **0.030** y Breslow: **0.011** .



Lo que nos viene a decir que los pacientes cuyos valores postoperatorios de VEGF, se mantengan por encima de 343 pg/mL, tienen menos esperanza de sobrevivir que los pacientes con valores inferiores a 343 pg/mL.

MVD.- El estudio de la densidad de microvasos, en relación con las otras variables objeto de esta tesis, p53 y VEGF, no ha mostrado ninguna significación.

Respecto a los factores pronóstico: estadio, diferenciación tumoral, afectación ganglionar y recidiva, la MVD no ha mostrado significación alguna.

La utilidad de la MVD como factor pronóstico en los pacientes con cáncer colorrectal, es motivo de controversia y aún por dilucidar. Mientras que unos autores(141-142,157-159,160-164) le confieren gran valor pronóstico, encontrando relación entre mayor recurrencia, poder metastásico y menor supervivencia en pacientes con tumores con mayor densidad de microvasos, otros niegan dicho valor (165-172).

Estos datos contradictorios vienen propiciados:

- ♦ Muestras no homogéneas
- ♦ Selección de pacientes: estadios, tratamiento coadyuvante etc.
- ♦ Y finalmente la heterogeneidad en el método empleado en el estudio de la MVD, comentado en el apartado anterior.

En nuestra serie la MVD, ha resultado estadísticamente significativa, respecto a la mortalidad, tanto en análisis no paramétricos : prueba U de Mann-Whitney **p=0.030** , como en análisis de regresión logística univariante: **p=0.042**, y multivariante junto con el p53 y el VEGF donde aumenta su significación a niveles: **p=0.024**. En este modelo se clasificarían correctamente los pacientes que sobreviven en el 94.8% de los casos y el 23% de los pacientes que han fallecido. Con una sensibilidad del 60% y una especificidad del 92%.

El análisis de la mortalidad mediante regresión de Cox, con la MVD como variable independiente, le confiere significación estadística a nivel **p=0.023** , cuando esta prueba se realiza multivariante, añadiendo al MVD, el p53 y el VEGF como variables independientes, el

nivel de significación del MVD es de **p=0.007**. Con una relación de disparidad de 1.005 o lo que es lo mismo que por cada punto que aumente la MVD, la mortalidad aumentará 1.005.

En un modelo de regresión logística, con la mortalidad como variable dependiente y como variables a estudiar: p53, VEGF pre y postoperatorio, MVD, CEA pre y postoperatorio y CA 19-9; solo los valores de VEGF postoperatorio y de MVD se muestran como independientes con significación: **p=0.025** para el VEGF y de **p=0.018** para la MVD. Este modelo clasificaría correctamente al 94.8% de los pacientes que sobreviven y al 69% de los fallecidos; con una sensibilidad del 81.8% y una especificidad del 90%.

Se puede afirmar que los pacientes con mayor MVD sobreviven menos que los pacientes con menor MVD.

CONCLUSIONES

- ♦ La mutación del p53, expresada en tejido tumoral, no condiciona los valores de VEGF, ni la densidad de microvasos tumoral. La mutación del p53, no aporta información adicional, ni valor pronóstico, en pacientes con cáncer colorrectal.
- ♦ Los niveles séricos de VEGF, se encuentran más elevados en pacientes con carcinoma colorrectal, que en sujetos sanos. Los niveles de VEGF, disminuyen significativamente una vez extirpado el carcinoma. Los niveles séricos de VEGF pre y postoperatorio, se correlacionan con el grado de diferenciación tumoral. Los valores séricos del VEGF, no condicionan, ni se relacionan con la densidad de microvasos tumoral.
- ♦ Los pacientes con niveles elevados de VEGF postoperatorio, tienen mayor índice de recidiva. Los pacientes con niveles de VEGF pre y postoperatorio altos, tienen mayor índice de mortalidad. La recidiva no se ve influenciada por la densidad de microvasos tumoral. Los pacientes cuya densidad de microvasos tumoral es elevada, tienen mayor mortalidad.
- ♦ Tanto los niveles séricos de VEGF pre y postoperatorio, como la densidad de microvasos tumoral, fortalecen el poder predictivo, respecto a la recidiva y a la mortalidad, de los marcadores tumorales actualmente utilizados: CEA y CA 19-9. Las determinaciones de VEGF pre y postoperatorio, así como la densidad de microvasos tumoral, aporta información adicional sobre el pronóstico de pacientes con cáncer colorrectal. Puesto que los niveles de VEGF, se encuentran elevados en pacientes con cáncer colorrectal, disminuyendo tras la extirpación del tumor y muestran significación respecto a la recidiva y mortalidad de estos pacientes; podría perfilarse como un marcador tumoral. Si bien se precisarían estudios, con

mayor numero de pacientes y seguimiento completo a cinco años, para confirmar estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Black, RJ, Bray, F , Ferlay,J, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in the Eropean Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. Eur.J.Cancer 1997; 33(7): 1075-1107
- 2.- Helad R, Husband E, Ryall R. The mesorectum in rectal cáncer surgery-the clue to pelvic recurrence? Br J Surg 1982; 69: 613-18
- 3.- Koyama Y, Kotake K. Overview of colorectal cáncer in Japan. Dis Col Rectum 1997; 40(Suppl): 2-9.
- 4.- Bresalier R S. The biology of colorectal cancer metastasis. Gastroenterol Clin North Am 1996; 25(4): 805-820.
- 5.- Fidler I J. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fata of tumor emboli labelled with 125 I-5-iodo-2 deoxyuridine. J Natl Cancer Inst 1970; 45:773.
- 6.- Fearon E R, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-67.
- 7.-Fidler I J, Kripke M L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. Science 1977; 197: 893-5.
- 8.- Vogelstein B, Fearon E R, Hamilton S R, Kern S, Preisinger AC, Leppert M et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. N Eng J Med 1988; 319: 525-32.
- 9.- Cerottini J P. The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. Am J Surg 1998; 175(3): 198-202.
- 10.- Tortola S, Marcuello E, Gonzalez I,Reyes G, Arribas R, Aiza G, et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorrectal cáncer. J Clin Oncol 1999; 17(5): 1375-81.

- 11.- Iniesta P, de Juan C, Caldes T, Vega FJ, Massa MJ, Cerdán FJ, et al. Genetic abnormalities and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 1998; 22(5): 383-95.
- 12.- Rosen N. Cancer of the gastrointestinal tract. In De Vita V. Jr, Hellman S, Rosenberg SA, (ed): *Cáncer principles and practice of oncology*, ed 5 Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997, pp 971-78.
- 13.- Remvikos Y, Tominaga O, Hammael P, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Dutrillaux B, et al. Increased p53 protein content of colorectal tumors correlates with poor survival. *Br J Cancer* 1992; 66: 758-64.
- 14.- Sun FX, Carstensen JM, Zhang H, Stal O, Ningren S, Hatschek T, et al. Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 1992; 340: 1369--73.
- 15.- Bosari S, Giuseppe V, Bossi P, Maggioni M, Coggi G, Murray JJ, et al. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: An independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 681-87.
- 16.- Jernvall P. Morphological and genetic abnormalities in prediction of recurrence in radically operated colorectal cancer. *Anticancer Res* 1999; 19(2B): 1357-62.
- 17.- Caldes T, Iniesta P, Vega FJ, De Juan C, López JA, Diaz-Rubio E, et al. Comparative survival analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in colorectal cancer. *Oncology* 1998; 55: 249-57.
- 18.- Kressner U. Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(2): 593-9.
- 19.- Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev* 1994; 8: 1174-83.
- 20.- Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 213-21.

- 21.- Kataoka M, Okabayashi T, Johira H, Nakatani S, Nakashima A, Takeda A, et al. Aberration of p53 and DCC in gastric and colorectal cancer. *Oncol Rep* 2000; 7(1): 99-103.
- 22.- Sun XF, Rutten S, Zhang H, Nordenskjold B. Expression of the deleted in colorectal cancer gene is related to prognosis in DNA diploid and low proliferative colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17(6): 1745.
- 23.- Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E. Reduced expression of nm23 protein is associated with advanced tumor stage and distant metastases in human colorectal carcinomas. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1993; 63: 213-18.
- 24.- Yamaguchi A, Urano T, Fushida S, Furukawa K, Nishimura G, Yoremura Y, et al. Inverse association of nm23-H1 expression by colorectal cancer with liver metastasis. *Br J Cancer* 1993;68: 1020-24.
- 25.- Indinnimeo M, Giarnieri E, Stazi A, Cicchini C, Brozzetti S, Valli C, et al. Early stage human colorectal cancer value of nm23-H1 protein overexpression. *Cancer Lett* 1997; 111(1-2): 1-5.
- 26.- Berney CR, Yang JL, Fisher RJ, Russell PJ, Crowe PJ. Overexpression of nm23 protein assessed by color video image analysis in metastatic colorectal cancer: correlation with reduced patient survival. *World J Surg* 1998; 22(5): 484-90.
- 27.- Berney CR, Fisher RJ, Yang J, Russell PJ, Crowe PJ. Protein markers in colorectal cancer. *Ann Surg* 1999; 230(2): 179-84.
- 28.- Lindmark G. Nm-23 H1 immunohistochemistry is not useful as predictor of metastatic potential of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1996; 74(9): 1413-18.
- 29.- Heis SD, Langlois N, Smith IC, Walker LG, Eremin O. Nm23 gene product expression does not predict lymph node metastases or survival in young patients with colorectal cancer. *Oncol Rep* 1998; 5(3): 735-9.

- 30.- Tabuchi Y, Nakamura T, Kuniyasu T, Ohno M, Nakae S. Expression of nm23-H1 in colorectal cancer: No association with metastases, histological stage, or survival. *Surg Today Jpn J Surg* 1999; 29: 116-20.
- 31.-Gofuku J, Shiozaki H, Tsujinaka T, Inoue M, Tamura S, Doki Y, et al.Expression of E-cadherin and alpha-catenin in patients with colorectal carcinoma. Correlation with cancer invasion and metastasis. *Am J Clin Pathol* 1999; 111(1):29-37.
- 32.- Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, Northover JM, Hart IR. E-cadherin expression in colorectal cancer.An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1993;142(4):981-6.
- 33.- Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava EM, Kosma MV. Reduced expression of alpha catenin is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 1999;52(1):10-6.
- 34.- Karatzas G, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Chatzgianni E, Papanikolaou S, Riza F, et al. E-cadherin expression correlates with tumor differentiation in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 1999;46(25):232-5.
- 35.- Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76 (5): 2268-72.
- 36.- Yu AE, Hewitt RE, Connor EW, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Drugs & Aging* 1997; 11 (3): 229-244.
- 37.- Seiki M. Membrane type-matrix metalloproteinase and tumor invasion. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 23-32.
- 38.- Sato H, Takino T, Okada Y et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994; 370: 61-65.

- 39.- Will H, Hinzmann B. cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem* 1995; 231: 602-608.
- 40.- Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJC. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg* 1997; 84: 160-166
- 41.- McDonnell S, Chaudhry V, Mansilla-Soto J, Zeng ZS, Shu WP, Guillem JG. Metastatic and non-metastatic colorectal cancer cells induce host metalloproteinase production in vivo. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17(4): 341-49
- 42.- Zeng ZS, Guillem JG. Unique activation of matrix metalloproteinase-9 within human liver metastasis from colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78(3): 349-53
- 43.- Zeng ZS, Guillem JG. Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastasis. *Br J Cancer*; 72(3):575-82
- 44.- Zeng ZS, Guillem JG. Colocalisation of matrix metalloproteinase-9-mRNA and protein in human colorectal cancer stromal cells. *Br J Cancer* 1996; 74(8):1161-7
- 45.- Swallow CJ, Murray MP, Guillem JG. Metastatic colorectal cancer cells induce matrix metalloproteinase release by human monocytes. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14(1): 3-11
- 46.- Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1999; 20(5): 749-55
- 47.- Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol* 1996; 14(12):3133-40.
- 48.- Karakiulakis G, Papanikolaou C, Jankovic SM, Aletras A, Papakonstantinou E, Vretou E, Mirtsou-Fidani V. Increased type IV collagen-degrading activity in metastases originating from primary tumors of the human colon. *Invasion Metastasis* 1997; 17(3): 158-68

- 49.- Kim TS, Kim YB. Correlation between expression of matrix metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis in colorectal adenocarcinoma. J Korean Med Sci 1999; 14(3): 263-70
- 50.- Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. Gut 1999; 45(2): 252-8
- 51.- Mori M, Barnard GF, Mimori K, Ueo H, Akiyoshi T, Sugimachi K. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas. Cancer 1995;75(&):1516-19
- 52.- Murray G, Duncan M, O'Neil P, Melvin W, Fothergill J. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. Nature Medicine 1996; 2:461-62.
- 53.- Schwartz MK. Tissue cathepsins as tumor markers. Clinica Chimica Acta 1995;237:67-68
- 54.- Keyszer G, Lambiri I, Keysser M, et al. Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity. Z Rheumatol 1998; 57 (6): 392-398.
- 55.- Sloane BF, Moin K, Sameni M, et al. Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene. Journal of Cell Science 1994; 107:373-384.
- 56.- Adenis A, Huet G, Zerimech F, et al. Cathepsin B, L, and D activities in colorectal carcinomas: relationship with clinicopathological parameters. Cancer Letters 1995; 96:267-275.
- 57.- Santamaría I, Velasco G, Cazorla M, et al. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. Cancer Research 1998; 58:1624-1630.
- 58.- Peláez Buján MC, Ruibal Morell A, Aza González J. Comportamiento biológico de los receptores de estrógenos, receptores de la progesterona y catepsina D en el adenocarcinoma gástrico. Cir Esp 1999; 65: 91-95.

- 59.- Maciewicz RA, Wardale RJ, Etherington DJ, et al. Immunodetection of cathepsins B and L present in and secreted from human pre-malignant and malignant colorectal tumour cell lines. *Int J Cancer* 1998; 43: 478-486.
- 60.- Mayer A, Fritz E, Fortelny R, et al. Immunohistochemical evaluation of cathepsin D expression in colorectal cancer. *Cancer Investigation* 1997; 15 (2): 106-110.
- 61.- Hirano T, Manabe T, Takeuchi S. Serum Cathepsin B levels and urinary excretion of cathepsin B in the cancer patients with remote metastasis. *Cancer Letters* 1993 ; 70 :41-40.
- 62.- Campo E, Muñoz J, Miquel R, et al. Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumour progression and shortened patient survival. *American Journal of Pathology* 1994; 145 (2):301-309.
- 63.-Khan A, Path MRC, Krishna M, et al. Cathepsin B and tumor-associated laminin expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Mod Pathol* 1998; 11 (8): 704-708.
- 64- Hirai K. Expression of cathepsin B and cystatin C in human colorectal cancer. *Hum Pathol* 1999; 30 (6):680-686,
- 65.- Van Noorden CJ, Jongens TG, Van Marle J, Bissell ER, Griffini P, Jans M,et al. Heterogeneous suppression of experimentally induced colon cancer metastasis in rat liver lobes by inhibition of extracellular cathepsin B. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16 (2):159-167.
- 66.- Murnane MJ, Shuja S, Del Re E, Cai J, Iacobuzio-Donahue C, Klepeis V. Characterizing human colorectal carcinomas by proteolytic profile. *In Vivo* 1997;11(3):209-16.
- 67.- Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124(4):619-26.
- 68.-Chao C, Lotz MM, Clarke AC, Mercurio AM. A function for the integrin alpha6beta4 in the invasive properties of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 1996;56(20):4811-9.

- 69.-Agrez MV, Bates RC, Mitchell D, Wilson N, Ferguson N, Anseline P, et al. Multiplicity of fibronectin-binding alpha V integrin receptors in colorectal cancer. Br J Cancer 1996;73(7):887-92.
- 70.- Nakamori S, Watanabe H, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, et al. Expression of autocrine motility factor receptor in colorectal cancer as a predictor for disease recurrence. Cancer 1994;74(7):1855-62.
- 71.-Hirono Y, Fushida S, yonemura Y, Yamamoto H, Watanabe H, Raz A. Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer. Br J Cancer 1996;74(12):2003-7.
- 72.- Sanchez-Rovira P, Jimenez E, Carracedo J, Barneto IC, Ramirez R, Aranda E. Serum levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in patients with colorectal cancer: inhibitory effect on cytotoxicity. Eur J Cancer 1998;34(3):394-8.
- 73.- Velikova G, Banks RE, Gearing A, Hemingway I, Forbes MA, Preston SR, et al. Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer. Br J Cancer 1998;77(11):1857-63.
- 74.- Wittig BM, Kaulen H, Thees R, Schmitt C, Knolle P, Stock J, et al. Elevated serum E-selectin in patients with liver metastases of colorectal cancer. Eur J Cancer 1996; 32A(7):1215-8.
- 75.-Brodt P, Fallavollita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Woltzky BA. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. Int J cancer 1997; 71(4):612-9.
- 76.- Hoff SD, Matsushita Y, Ota DM, Cleary KR, Yamori T, Hakomori S, et al. Increased expression of sialyl-dimeric LeX antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma. Cancer Res 1989;49:6883-8.
- 77.- Nakamori S, Kameyama M, imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, et al. Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with

colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res* 1993;53(15):3632-7.

78.- Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, et al. Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis(x) in colorectal cancer metastasis. *Dis Colon Rectum* 1997;40(4):420-31.

79.- Yamada N, Chung YS, Maeda K, Sawada T, Ikehara T, Nishino H, et al. Increased expression of sialyl Lewis A and sialyl Lewis X in liver metastases of human colorectal carcinoma. *Invasion Metastasis* 1995;15:95-102.

80.-Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GF, Adolf GR, Van den Berg FM, Ponta H, et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993; 53(20):4754-6.

81.-Yamaguchi A, Urano T, Goi T, Saito M, Takeuchi K, Hirose K, et al. Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 1996;14(4):1122-7.

82.- Masson D, Denis MG, Denis M, Blanchard D, Loirat MJ, Cassagnau E, et al. Soluble CD44: quantification and molecular repartition in plasma of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 80(12):1995-2000.

83.- Algire GH and Chalkey HW. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice wounds and to normal and neoplastic implants. *J. Natl Cancer Inst* 1945;6: 73-85.

84.- Coman DR and Sheldon WF. The significance of hyperemia around tumor implants. *Am J Pathol* 1946; 22: 821-831.

85.- Greenblatt M and Shubi P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41: 111-124.

86.- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Eng J Med* 1971; 285: 1182-6.

- 87.- Folkman J, Merler E, Abernathy C and Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971, 133. 275-288.
- 88.- Folkman J. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 1974; 34: 2109-2113.
- 89.- Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butlerfield C, Murray J and Klagsbrun M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 1984; 223: 1296-1299.
- 90.- Folkman J and Klagsbrun M. Angiogenic factor. *Science* 1987; 235: 442-447.
- 91.- Klagsbrun M and Soker S. VEGF/VPF: the angiogenesis factor found?. *Curr Biol* 1993; 3: 699-702.
- 92.- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovascular Med* 1993; 3: 244-250.
- 93.- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992; 13: 18-32.
- 94.- Senger DR, Van De Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo K-T, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM and Dvorak HF. Vascular permeability factor (VPE, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12: 303-324.
- 95.- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?. *J Nat Cancer Inst.* 1990; 82: 4-6.
- 96.- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845.
- 97.- Miuchenko A, Baner T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1994; 71: 374-379.
- 98.- Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo K-T, Allende M, Folkman F, D'Amore PA. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factors in the retina: identification and characterization of vascular endothelial growth factor(VEGF) as the sole mitogen. *Mol Med* 1995; 2: 64-71.

- 99.- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
- 100.- Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14: 699-703.
- 101.- Rak J, Mitsuhashi Y, Bayco L, Filmus J, Shirasawa S, Sabazuki T, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VEGF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55: 4575-80.
- 102.- Zabrenetsky V, Harns C, Steeg PS, Roberts DD,. Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression of melanoma, lung and breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1994; 59: 191-95.
- 103.- Keiser A, Wiech HA, Bradnes G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9: 936-39.
- 104.- Mukopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 1995; 55: 6161-65.
- 105.- Kondo Y, Arii S, Furutani M, Isigani SI, Mori A, Onodera H, Chiba T, Imamura M. Implication of vascular endothelial growth factor and p53 status for angiogenesis in non invasive colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 1820-27.
- 106.- Park JE, Keller G-A, Ferrar N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into subepithelial extracellular matrix and bioactivity of ECM-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1317-1326.
- 107.- Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF and Senger DR. Vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages and tumors. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 211-20.

- 108.- Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR and Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of gastrointestinal final tract. *Cancer Res* 1993; 53:: 4727-35.
- 109.- Pepper MS, Ferrara N, Orcil L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 824-31.
- 110.- Mignatti P and Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73: 161-95.
- 111.- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M and Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146(5): 1029-39.
- 112.- Hek RD, Harris AL and Lewis CE. Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 423-35.
- 113.- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Seling M, Nielsen G, Taksir T, Jain R and Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998; 94: 715-25.
- 114.- Burgess WH and Maciag T. The heparin- binding(fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 575-606.
- 115.- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G and Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 1997; 18: 26-45.
- 116.- Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E and Rifkin DB. In vitro angiogenesis of the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 1989; 108: 671-82.
- 117.- Miyazono K, Okabe T, Urabe A, Takaku F, Heldin CH. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J Biol Chem* 1987; 262(9): 4098-103.

- 118.- Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, et al. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelets- derived endothelial cell growth factor. *Nature* 1989; 338(6216): 557-62.
- 119.- Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, Haraguchi M, Akiyama F, Fukui K, et al. Angiogenic factor (letter). *Nature* 1992; 356(6371): 668.
- 120.- Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cell [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(16): 1146-51.
- 121.- Moghaddam A, Choudhuri R and Bicknell R. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor: an angiogenic enzyme. In Bicknell R, Lewis CE and Ferrara N.(ed): *Tumor angiogenesis*. Oxford, Oxford University Press, 1997. pp: 251-260.
- 122.- Felt JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Valle BL. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 1985; 24(20): 5480-6.
- 123.- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Mainsopierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1 a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87: 1161-69.
- 124.- Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest* 1999; 103(2): 157-8.
- 125.- Holash J, Mainsopierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994-98.
- 126.- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.

- 127.- O'Reilly MS, Boehm T, Fukai N, Varios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olse BR, Folkman J. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-285.
- 128.- Rangi GJ, Munby SM, Abbott D, Bornstein P. Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture. *J Cell Biol* 1982; 95(1): 351-4.
- 129.- Streit M, Riccardi L, Velasco P, Brown LF, Hawighorst T, Bornstein P, Detmar M. Thrombospondin-2: A potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96(26): 14888-14893.
- 130.- Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler I. Interferon alfa and beta down- regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 4562-66.
- 131.- Jhalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gerteinstein M, Wu X-F, Breitman ML and Schuh AC. Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-6.
- 132.- Fang G-H, Rassant J, Gertenstein M and Breitman ML. Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulation of assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.
- 133.- Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML. Tek, novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells, and their presumptive precursors. *Oncogene* 1992; 7: 1471-1480.
- 134.- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg Hrisau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinase Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995;376: 70-74.
- 135.- FinlayCa, Hinds PW, Tan TH, Eliyehu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 700-p53 complex with an altered half-life. *Moll Cell Biol* 1988, 8: 531-39.

- 136.- Levin AJ, Momand J, Finlay AC. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-456.
- 137.- Weidner N, Semple JP, Welch WR and Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis - Correlation in invasive breast carcinoma. *New England J M* 1991; 324(1): 1-7.
- 138.- Bouck N. Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and suppressor genes. *Cancer Cells* 1990; 2: 179-185.
- 139.- Kerbel RS, Vitoria-Petit A, Okada F and Rak J. Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4: 286-295.
- 140.- Kang S-M, Maeda K, Onoda N, Chung Y-S, Nakata B, Nishiguchi Y and Sowa M. Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of vascularity and liver metastasis. *Int J Cancer(Pred. Oncol.)* 1997; 74: 502-507.
- 141.- Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsibanou E, Papadimitriou C, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2 and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 1421-30.
- 142.- Vermeulen PB, Van den Eynden GG, Huget P, Goovaerts G, Weiler J, Lardon F, van Merck E, Hubens G and Dirix LY. Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79(2): 316-22
- 143.- Matsuura T, Fukuda Y, Fujitaka T, Nishisada T, Sakatani T, Ito H. Preoperative treatment with tegafur suppositories enhances apoptosis and reduces the intramural microvessel density of human colorectal cancer. *Cancer* 2000; 88: 1007-15.
- 144.- Pricolo VE, Finkelstein SD, Wu TT, Keller G, Bakker A, Swalsky PA, Bland KI. Prognostic value of TP53 and k-ras-2 mutational analysis in stage III carcinoma of the colon. *Am J Surg* 1996; 171(1): 41-6.

- 145.- Manne U, Myers RB, Moron C, Poczatck RB, Dillard S, Weiss H, Brown D, Srivastava S, Grizzle WE. Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1997; 74: 346-358.
- 146.- Kahlenberg M, Stoler DL, Rodriguez-Bigas MA, Weber TK, Dirscoll DL, Anderson GR, Petrelli NJ. P53 tumor suppressor gene mutation predict decrease survival of patients with sporadic colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88(8): 1814-19.
- 147.- Diez M, Pollan M, Múguez JM, Gaspar MG, Duce AM, Alvarez MJ, Ratia T, et al. Time-dependency of the prognostic effect of carcinoembryonic antigen and p53 protein in colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88(1): 35-41.
- 148.- Schwandner O, Schiedck THK, Bruch H-P, Duchrow M, Windhoevel U, Broll R. Apoptosis in rectal cancer: Prognostic significance in comparison with clinical, histopathologic and immunohistochemical variables. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 1227-36.
- 149.- Yamamoto Y, Toi M, Kondo S, Matsumoto T, Suzuki H, Kitamura M et al. Concentration of vascular endothelial growth factor in the sera of normal control, cancer patients. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 821-26.
- 150.- Fujisaki K, Mitsuyama K, Toyonaga A, Matsuo K and Tunikawa K. Circulating vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(2): 249-52.
- 151.- Kraft A, Weindel K, Ochs A, Marth C, Zmija J, Schumacher P, et al. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and non-malignant disease. *Cancer* 1999; 85: 178-87.
- 152.- Davies MM, Jonas SK, Kaur S and Allen-Mersh TG. Plasma vascular endothelial but not fibroblast growth factor levels correlate with colorectal liver metastasis vascularity and volumen. *Br J Cancer* 2000; 85(2): 1004-8.
- 153.- Dirix LY, Vermeulen PB, Powinski A, Prove A, Benoy I, De Pooter C, Martin M and Van Oosterom AT. Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and

vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. Br J Cancer 1997; 76(2): 238-243.

154.- Hyodo I, Doi T, Endo H, Hosokawa Y, Tanimizu M, Jinno K and Kotani J. Clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer. Eur J Cancer 1998; 34(13):2041-45.

155.- Paulopouloulou PM, Konstantinidou AE, Agapitos E, Nikolopoulou P and Davaris P. A morphometric study of neovascularization in colorectal carcinoma. Cancer 1998; 83(10): 2067-75.

156.- Chin K-F, Greenman J, Gardnier E, Kumar H, Topping K and Monson J. Pre-operative serum vascular endothelial growth factor can select patients for adjuvant treatment after curative resection in colorectal cancer. Br J Cancer 2000; 83(11): 1425-31.

157.- Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab EA, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. Dis Colon Rectum 1994; 37: 921-26.

158.- Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA and Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. Ann Surg 1995; 222(6): 695-99.

159.- Mooerti S, Rubin D, Leurgans S, Jakate S, Drab E, Saclarides T. Tumor angiogenesis in primary and metastatic colorectal cancers. Dis Colon Rectum 1996; 39: 1073-1080.

160.- Takebayashi Y, Akiyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as a unfavourable prognostic factor in human colorectal carcinoma. Cancer 1996; 78: 226-31.

161.- Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, Kuwano H, Maehara Y, Sugimachi K. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorctal cancer. Cancer 1996; 77: 1722-8.

162.- Engel CJ, Bennett ST, Chambers AF, Gordon SD, Kerkvliet N and O'Malley FP. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer controlled for Dukes staging. Am J Surg Pathol 1996; 20(10): 1260-5.

- 163.- Takahashi Y, Tucker S, Kitadai Y, Koura AN, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Vessel count and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg* 1997; 132: 541-6.
- 164.- Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, Muraoka R. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1043-6.
- 165.- Choi HJ, Hyun MS, Jung GJ, Kim SS, Hong SH. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology* 1998; 55: 575-81.
- 166.- Bossi P, Viale G, Lee AKC, Alfano RM, Coggi G, Bosari S. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantification in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1995; 55: 5049-53.
- 167.- Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, Pahlman L, Bergström R and Glimelius B. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 461-6.
- 168.- Banner BF, Whitehouse R, Baker SP and Swanson RS. Tumor angiogenesis in stage II colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 733-7.
- 169.- Galindo M, Fernandez MJ, Sanz J, Aljama A. Vascular enumeration as a prognosticator for colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 2000; 36: 55-60.
- 170.- Pietra N, Sarli L, Caruana P, Cabras A, Costi R, Gobbi S, Bordi C, Peracchia A. Is tumor angiogenesis a prognostic factor in patients with colorectal cancer and no involved nodes? *Eur J Surg* 2000; 166: 552-6.
- 171.- Chen CN, Cheng YM, Liang JF, Lee PH, Hsieh FJ, Wang SM, Chang MF, Chang KJ. Color Doppler vascularity index can predict distant metastasis and survival in colon cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60(11): 2892-7.

172.- Yoshimura H, Chikamoto A, Honda T, Tashiro K, Nakamoto T Takano M, Takagi K, Nagasue N, Soma G. Relationship between microvessel quantification and inducibility of endogenous tumor necrosis factor in colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20(1C): 629-33.

173.- PetersenS, Thames HD, Nieder C, Petersen C, Baumann M. The results of colorectal cancer treatment by p53 status. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 322-334.